

**EURICO JACQUES DORNELLES NETO**

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DO FATOR  
TECIDUAL E DA DENSIDADE MICROVASCULAR EM  
ESPÉCIMES DE RESSECÇÃO ENDOSCÓPICA DE  
CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA**

Porto Alegre

2008

**EURICO JACQUES DORNELLES NETO**

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DO FATOR  
TECIDUAL E DA DENSIDADE MICROVASCULAR  
EM ESPÉCIMES DE RESSECÇÃO ENDOSCÓPICA DE  
CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio  
Grande do Sul para obtenção de título de  
Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal  
Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Porto Alegre

2008

D713e Dornelles Neto, Eurico Jacques.

Estudo imunoistoquímico da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular em espécimes de ressecção endoscópica de carcinoma urotelial de bexiga / Eurico Jacques Dornelles Neto; orient. Gustavo Franco Carvalho, co-orient. Vinícius Duval da Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

63 f.: il. gráf. tab.

Tese(Doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. Neoplasia da Bexiga Urinária. 2. Imunoistoquímica. 3. Tromboplastina. 4. Angiogênese. 5. Estudos de Coortes. I. Carvalho, Gustavo Franco. II. Silva, Vinícius Duval da. III. Título.

CDD 616.99462  
NLM WJ 504

Bibliotecária Responsável:  
Sabrina Caimi Silva da Costa  
CRB10/1606

À minha mulher, Carolina, pelo incentivo nos momentos de desânimo, por nunca me deixar perder o foco e pelo inestimável auxílio para a concretização desta Tese.

Ao meu filho, Gabriel, pelos longos períodos de ausência para a conclusão deste objetivo.

Aos meus pais, Cristina e Lauro, por terem me proporcionado todas as condições para minha realização pessoal e profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Gustavo Franco Carvalhal, pela orientação, sugestões e grande comprometimento com este estudo.

Ao professor Vinícius Duval da Silva, pelo auxílio crítico na interpretação dos exames e por proporcionar a estrutura para análise digital das imagens.

À Dra. Ana Geiger e ao técnico Augusto Cristiano López, pela realização da imunoistoquímica.

Ao professor Carlos Luiz Reichel, pela reavaliação das lâminas.

Ao Drs. Carlos Eduardo Fay e Guilherme Rosa, pelo auxílio na complementação do banco de dados.

Aos colegas da linha de pesquisa em angiogênese e fator tecidual, Drs. Marcelo Toneto, Lúcio Fillmann, Gérson Maahs e Elinês Maciel, pelo auxílio diante das dificuldades encontradas durante a realização do estudo.

E, por fim, mas não o menos importante, meu agradecimento ao professor Henrique Sarmiento Barata, pelo incentivo para a realização deste projeto, pelo exemplo profissional e de postura ética.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	3
2.2 FATORES DE RISCO .....	4
2.3 APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	7
2.4 FATORES PROGNÓSTICOS.....	8
2.4.1 Marcadores Prognósticos Imunoistoquímicos .....	10
2.5 ANGIOGÊNESE TUMORAL.....	13
2.6 FATOR TECIDUAL .....	18
3 OBJETIVOS .....	27
4 PACIENTES E MÉTODOS .....	28
4.1 DELINEAMENTO E AMOSTRA .....	28
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	29
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	29
4.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO .....	30
4.5 IMUNOISTOQUÍMICA .....	30
4.6 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS.....	31
4.7 DENSIDADE MICROVASCULAR .....	31
4.8 EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL .....	33

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
4.10 ÉTICA .....	34
5 RESULTADOS .....	35
5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA .....	35
5.2 DENSIDADE MICROVASCULAR .....	36
5.3 EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL .....	36
5.4 RELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL E DENSIDADE MICROVASCULAR .....	38
5.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA.....	40
6 DISCUSSÃO .....	43
7 CONCLUSÕES .....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> - fator de crescimento de fibroblastos básico
CCR	Carcinoma de células renais
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAB	Diaminoazobenzidina
DP	Desvio padrão
DMV	Densidade microvascular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> - receptor do fator de crescimento epidérmico
FT	Fator tecidual
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
GB	Gigabyte
HE	Hematoxilina-eosina
HSL	Hospital São Lucas
MB	Megabyte
NAT	N-acetiltransferase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PSA	<i>Prostatic specific antigen</i> - antígeno prostático específico
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results Program</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i> - inibidor da via do fator tecidual
TIFF	<i>True image format file</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - fator de crescimento do endotélio vascular

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Risco de neoplasia de bexiga estratificado por sexo e raça na população norte-americana .....	3
Tabela 2 - Sobrevida estratificada por sexo e raça na população norte-americana.....	4
Tabela 3 - Classificação de TNM 2002.....	8
Tabela 4 – Classificação quanto ao grau - OMS 1973.....	9
Tabela 5 - Classificação quanto ao grau - OMS 2004 .....	9
Tabela 6 - Substâncias endógenas com efeito angiogênico .....	15
Tabela 7 - Características clínicas e patológicas da população estudada (n = 67).....	35
Tabela 8 - Correlação entre as características clínico-patológicas e DMV.....	36
Tabela 9 - Expressão do fator tecidual em espécimes de carcinoma urotelial de bexiga .....	37
Tabela 10 - Correlação entre as características clínico-patológicas e expressão de FT .....	38
Tabela 11 - Relação entre o fator tecidual e a densidade microvascular em carcinoma urotelial de bexiga .....	39

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1- Coloração de microvasos (marrom) por anticorpos antiCD 34 em secção tumoral (magnificação de 100X).....	32
Figura 2 - Imagem obtida no programa após a inserção de grades de correção para contagem dos microvasos (magnificação de 400X). .....	33
Figura 3 - Expressão de FT categoria 1 ( 0-25%).....	37
Figura 4 - Expressão de FT categoria 4 (76-100%).....	37
Figura 5 - Densidade microvascular (DMV) segundo categorias do fator tecidual em carcinoma urotelial de bexiga.....	39
Figura 6 - Curva de sobrevida geral dos pacientes. ....	40
Figura 7 - Gráfico de sobrevida (método de Kaplan-Meier) entre grupos com baixa (<20 microvasos/campo) e alta ( $\geq 20$ microvasos / campo) densidade microvascular..	41
Figura 8 - Gráfico de sobrevida (método de Kaplan-Meier) entre grupos de baixa expressão do fator tecidual ou moderada/alta expressão. ....	42

## RESUMO

A expressão do fator tecidual (FT) tem sido associada à maior densidade microvascular e a um pior prognóstico nos tumores de próstata, mama, pulmão, cólon e reto. Nos cânceres de bexiga, maior densidade microvascular tem se correlacionado com tumores de maior grau, estágio e mau prognóstico, mas a expressão do FT foi pouco estudada. No presente estudo, analisamos a expressão imunohistoquímica do FT e a densidade microvascular em espécimes de 67 pacientes submetidos à ressecção transuretral de carcinomas uroteliais de bexiga, correlacionando-os a estágio, grau e sobrevida geral. A densidade microvascular não se correlacionou com estágio, grau ou sobrevida em nossa amostragem. Cinquenta e um pacientes (76,01%) apresentaram tumores com >25% das células tumorais corando-se intensamente para FT. Não houve associação entre expressão do FT, estágio e grau. No entanto, identificou-se correlação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão do FT e a densidade microvascular. Além disso, houve diferença estatística quanto à sobrevida geral entre o grupo com baixa expressão ( $\leq 25\%$  das células corando-se intensamente) e os grupos com alta expressão (>25% das células corando-se intensamente) de FT. Sumarizando, maior expressão do FT correlacionou-se à maior angiogênese tumoral e à menor sobrevida geral em nossa casuística.

## ABSTRACT

Increased tissue factor (TF) expression has been correlated to an increased microvessel density (MVD) and to a worse prognosis in tumors of the prostate, breast, lungs, and in colorectal cancers. However, TF expression has not yet been studied in specimens of transurethral resections of bladder tumors. In transitional cell carcinomas of the bladder, increased microvessel density has already been correlated to tumors of higher grade and stage, and also to a worse prognosis. We have evaluated TF expression and MVD in tissue specimens of 67 patients treated with transurethral bladder tumor resection. Findings were correlated to variables such as tumor grade, stage, and overall survival. MVD was not correlated to stage, grade, and survival in our sample. Fifty-one patients (76.01%) expressed moderate to high levels of TF in their samples. There was no correlation between TF expression, stage and grade. However, there was a statistically significant correlation between TF expression and MVD. Likewise, an increased TF expression was correlated to lower survival rates. Further studies are necessary to establish the real value of an increased MVD and TF in bladder cancer.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga é a segunda neoplasia maligna mais freqüente no trato urinário e compreende amplo espectro de tumores que variam quanto a seu tipo histológico, estágio, potencial biológico de progressão e desenvolvimento de metástases. Dentre as neoplasias de bexiga, o carcinoma de células transicionais ou urotelial é o tipo histológico mais comum, acometendo aproximadamente 90% dos indivíduos.<sup>1</sup>

Quando um tumor na bexiga é diagnosticado, a primeira pergunta é se representa um tumor pouco agressivo, o qual, mesmo que apresente alta chance de recidiva, tem reduzida chance de progressão e de disseminação, ou se indica um tumor agressivo, com potencial biológico para invadir estruturas, causar metástases e levar o paciente ao óbito.

Dessa forma, as neoplasias de bexiga são comumente classificadas em tumores não-invasivos (antigamente denominados de superficiais) e em tumores invasivos. Os tumores não-invasivos acometem apenas as camadas mucosa e lâmina própria da bexiga, enquanto os tumores invasivos invadem a musculatura própria da bexiga. Alguns autores<sup>2,3</sup>, entretanto, têm levantado dúvidas quanto ao comportamento dos tumores não-invasivos, uma vez que estes se apresentam como um grupo heterogêneo quanto ao seu comportamento biológico. Cerca de 5 a 30% dos tumores, aparentemente não-invasivos, apresentam prognóstico mais reservado, com elevadas chances de progressão, comprometimento de estruturas adjacentes, metástases e óbito.

Sendo assim, uma estratificação mais acurada dos tumores de bexiga quanto ao seu comportamento biológico torna-se imperativa para que possamos melhor prever o prognóstico e indicar tratamentos mais agressivos quando necessário. Neste contexto, vários

centros de pesquisa têm investigado o papel de marcadores séricos, urinários, moleculares e imunoistoquímicos.

O presente trabalho propõe-se a revisar a literatura relativa a marcadores prognósticos no câncer de bexiga, além de correlacionar a densidade microvascular e a expressão do FT com fatores prognósticos reconhecidos (grau e estágio) e sobrevida.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

Dados norte-americanos apontam que a neoplasia de bexiga é o quarto tumor sólido mais freqüente em homens, ocorrendo em 7% dos indivíduos com câncer. Entre as mulheres, no entanto, ele não se encontra entre os dez tumores mais freqüentes,<sup>4</sup> sendo a doença três vezes mais comum nos homens. Quanto à raça, é duas vezes mais freqüente entre os caucasianos norte-americanos do que entre os negros e hispânicos, residentes nos Estados Unidos. O “*Surveillance, Epidemiology and End Results Program*” (SEER) estimou a probabilidade de que os indivíduos norte-americanos venham a ter neoplasia de bexiga diagnosticada ao longo da vida. (Tabela 1) Apesar de a neoplasia ser menos freqüente entre os negros, quando comparados com caucasianos, o prognóstico costuma ser pior, pois os negros apresentam tumores com comportamento mais agressivo e em estágios mais avançados.<sup>5</sup> (Tabela 2) Já os hispânicos tendem a apresentar tumores com prognóstico melhor do que os caucasianos e negros.<sup>6</sup>

**Tabela 1 - Risco de neoplasia de bexiga estratificado por sexo e raça na população norte-americana**

	<b>Risco de neoplasia de bexiga ao longo da vida</b>
Homens caucasianos	3,7%
Homens negros	1,3%
Mulheres caucasianas	1,2%
Mulheres negras	0,8%

**Tabela 2 - Sobrevida estratificada por sexo e raça na população norte-americana**

	<b>Sobrevida em cinco anos</b>
Homens caucasianos	84%
Homens negros	71%
Mulheres caucasianas	76%
Mulheres negras	51%

Os tumores de bexiga são a oitava causa de óbito por câncer nos homens, sendo responsáveis por, aproximadamente, 3% das mortes masculinas. Nas mulheres, no entanto, essa neoplasia não está entre as dez causas de óbito por câncer, sendo responsável por apenas 1,5% das mortes de causa oncológica.<sup>4</sup>

As neoplasias de bexiga podem ainda acometer indivíduos de qualquer faixa etária, mas raramente ocorrem antes dos 40 anos. A incidência, por outro lado, aumenta com a idade, sendo que dois terços dos casos ocorrem após os 65 anos. A média de idade de aparecimento nos homens é de 69 anos e, nas mulheres, é de 71 anos.<sup>5</sup> Quando ocorrem em indivíduos abaixo de 40 anos, as neoplasias costumam apresentar-se como tumores bem diferenciados e de comportamento indolente.<sup>7</sup> Diferentemente dos outros tumores sólidos frequentes, não costumam ser encontrados em autópsias, sugerindo que todos os tumores são diagnosticados ao longo da vida dos indivíduos.<sup>8</sup>

## **2.2 FATORES DE RISCO**

O contato crônico de carcinógenos com o urotélio parece ser o principal fator para o desenvolvimento das neoplasias de bexiga. Os carcinógenos lesam o DNA das células-alvo, iniciando e propagando o processo de gênese tumoral. Geralmente, os carcinógenos são

metabólitos de substâncias químicas que entram em contato com o organismo, a grande maioria aminas aromáticas.<sup>1</sup> Eles podem promover a ativação de oncogenes, como o P21 RAS, ou a inativação de genes supressores tumorais, como os P53, RB, P15, P16, P21, P27 e P19, que atuam como moduladores da resposta celular à carcinogênese.<sup>1</sup>

O tabagismo, por sua vez, é o principal fator causal de exposição a carcinógenos nos cânceres de bexiga, contribuindo para o desenvolvimento de 35% a 50% dos casos de neoplasias vesicais nos Estados Unidos. Indivíduos tabagistas têm risco quatro vezes maior de apresentarem tumor de bexiga do que indivíduos que nunca fumaram. Constatou-se, ainda, que o risco relativo aumenta de acordo com o número de carteiras de cigarro/ano consumidas e que ocorre significativa redução da taxa de surgimento dessas neoplasias entre indivíduos que param de fumar. Os ex-tabagistas, entretanto, somente alcançam o risco dos não-tabagistas após 20 anos de abstinência ao tabaco.<sup>1</sup> O tabagismo também é importante fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias de bexiga nas mulheres em idade pós-menopausa, com risco relativo de 3,58.<sup>1</sup>

Dentre os agentes presentes no fumo e implicados na carcinogênese dos tumores de bexiga estão as nitrosaminas, a 2-naftilamina, o 4-aminobifenil e os metabólitos do triptofano.<sup>9</sup>

Algumas atividades ocupacionais estão relacionadas à ocorrência de neoplasias de bexiga. Trabalhadores de determinadas profissões como as de mecânico, pintor, minerador, motorista de caminhão, agricultor e operários da borracha, corantes e alumínio estão permanentemente em contato com as arilaminas, substâncias carcinogênicas implicadas na gênese dos tumores de bexiga. Estima-se que até 20% dos indivíduos com neoplasia de bexiga tenham algum fator ocupacional associado.<sup>1</sup> Até mesmo naqueles pacientes com tumores vesicais, em que não se identifica especificamente a exposição a carcinógenos,

acredita-se que haja exposição a alguma substância carcinogênica que ainda não tenha sido relacionada diretamente à neoplasia.

A razão pela qual indivíduos expostos de forma e intensidade similar aos carcinógenos apresentarem diferentes riscos ao desenvolvimento da neoplasia de bexiga ainda não é bem compreendida. Provavelmente, isso esteja relacionado ao polimorfismo gênico de enzimas responsáveis pela desintoxicação dos carcinógenos. Sabe-se que as enzimas N-acetiltransferases (NAT) 1 e 2 estão envolvidas na ativação e desintoxicação dos carcinógenos, pela sua acetilação. Portanto, a NAT 2, a principal enzima acetiladora na desintoxicação das arilaminas, devido ao seu polimorfismo, pode manifestar-se com fenótipo acetilador rápido ou lento. Os indivíduos com fenótipo acetilador lento desintoxicam os carcinógenos mais lentamente e, devido a isso, facilitariam a ação dos carcinógenos na célula-alvo. Por sua vez, os acetiladores rápidos conseguem neutralizar a ação dos carcinógenos mais rapidamente, dificultando a gênese tumoral.<sup>10,11</sup>

A história de contato radiativo no passado também aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de bexiga. Sobreviventes da bomba atômica no Japão e do acidente da usina nuclear em Chernobyl apresentaram aumentado risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. Além disso, aqueles com história de irradiação pélvica para tratamento de câncer apresentam risco aumentado para desenvolvimento de neoplasia de bexiga de até quatro vezes.<sup>12</sup>

Também a utilização do quimioterápico ciclofosfamida está relacionada a risco aumentado em nove vezes para o desenvolvimento de neoplasias de bexiga.<sup>1</sup> O seu metabólito, acroleína, entra em contato com o urotélio e provoca o desenvolvimento de cistites hemorrágicas e de cânceres de bexiga.<sup>13</sup>

A cistite crônica também é fator de risco reconhecido para o desenvolvimento das neoplasias de bexiga e está associada principalmente ao surgimento de carcinomas

epidermóides. Ocorre geralmente entre indivíduos com sonda vesical de demora por longa data ou naqueles com cálculos vesicais.<sup>14</sup> No Egito, a infecção vesical pelo *Schistosoma haematobium* é endêmica e é considerada o fator de risco mais importante para o desenvolvimento das neoplasias vesicais.<sup>1</sup>

A diabetes melito também tem sido referida como um fator de risco para neoplasia de bexiga. Contudo, uma metanálise avaliando 16 estudos clínicos a respeito da relação entre diabetes melito e neoplasias de bexiga, concluiu ser ela um fator de risco fraco (risco relativo de 1,24).<sup>15</sup>

### **2.3 APRESENTAÇÃO CLÍNICA**

Os pacientes com tumores de bexiga costumam apresentar hematúria macro ou microscópica em cerca de 90% dos casos. Alguns pacientes, principalmente quando acometidos por carcinoma *in situ*, podem referir sintomas urinários irritativos como disúria, polaciúria e urgência miccional. Mais raramente, os pacientes podem apresentar dor no flanco, devido à obstrução ureteral pelo tumor, edema de membros inferiores e massas pélvicas.

De uma maneira geral, 75% dos tumores de bexiga apresentam-se como tumores não-invasivos, 20% como tumores músculo-invasivos e somente 5% se apresentam com metástase a distância.<sup>16</sup>

Quando se suspeita da presença de um tumor de bexiga, é imperativo realizar-se cistoscopia, para comprovar e caracterizar o tumor, e biópsia, através de ressecção endoscópica. O material é enviado para avaliação anátomo-patológica e classificado quanto ao seu tipo histológico, penetração da parede vesical (estágio) e grau de diferenciação celular.

Como o comportamento biológico difere entre os tumores, faz-se necessária a estratificação das neoplasias, respeitando suas características, agressividade e prognóstico. De maneira geral, utilizam-se fatores preditivos patológicos, estágio e grau, para melhor caracterizar o tumor. Entretanto, há busca contínua por novos marcadores prognósticos que possibilitem melhor caracterização da agressividade da doença.

## 2.4 FATORES PROGNÓSTICOS

O parâmetro prognóstico mais importante é o estágio patológico do tumor. Utiliza-se geralmente a classificação da União Internacional Contra o Câncer, chamada de TNM, estratificando-se os tumores de acordo com o comprometimento da parede vesical e estruturas adjacentes (T); presença ou não de linfonodos pélvicos neoplásicos (N); e presença ou não de metástase a distância(M).<sup>17</sup>(Tabela 3)

**Tabela 3 - Classificação de TNM 2002**

---

Tx: tumor não avaliado
Tis: lesão plana <i>in situ</i>
Ta: compromete apenas mucosa
T1: compromete a lâmina própria
T2: compromete a musculatura do músculo detrusor
T2a: compromete a camada superficial do músculo detrusor
T2b: compromete a camada profunda do músculo detrusor
T3: compromete a gordura perivesical
T3a: microscopicamente
T3b: macroscopicamente (massa extravesical)
T4: compromete estruturas adjacentes ou musculatura pélvica
T4a: compromete próstata, útero ou vagina
T4b: compromete parede pélvica ou parede abdominal
Nx: linfonodos regionais não avaliados
N0: ausência de linfonodos neoplásicos
N1: linfonodos neoplásicos
Mx: presença de metástase não avaliada
M0: ausência de metástase
M1: presença de metástase

---

Utiliza-se também, associado ao estágio patológico, o grau de diferenciação celular da neoplasia. A classificação universalmente utilizada até recentemente era a da Organização Mundial da Saúde (OMS) de Mostofi e colaboradores, apresentada em 1973, que classifica os tumores como é demonstrado na Tabela 4:<sup>18</sup>

**Tabela 4 –Classificação quanto ao grau - OMS 1973**

G1	tumor bem diferenciado
G2	tumor moderadamente diferenciado
G3	tumor indiferenciado

No entanto, em 1998, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica introduziu uma nova classificação (Tabela 5), e a OMS reconheceu-a em 2004 como a nova classificação para graduação dos tumores de bexiga.<sup>19</sup>

**Tabela 5 – Classificação quanto ao grau - OMS 2004**

Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno \*

Carcinoma urotelial papilar de baixo grau

Carcinoma urotelial papilar de alto grau

---

\* Utilizado apenas nos tumores de bexiga Ta.

Essa nova classificação vem sendo implantada gradualmente pelos patologistas, e a recomendação é que, nessa fase de transição entre as classificações, sejam utilizadas simultaneamente as duas classificações (OMS 1973 e OMS 2004) até que mais estudos clínicos sejam realizados.<sup>20</sup> Contudo, para a realização de estudos clínicos retrospectivos em que são avaliados casos anteriores à implantação dessa nova classificação, recomenda-se ainda a utilização da classificação da OMS 1973.<sup>21</sup>

Portanto, após a ressecção endoscópica, os tumores são estratificados de acordo com o comprometimento da parede vesical (T) e quanto ao grau de diferenciação celular. Mesmo com a avaliação desses parâmetros prognósticos patológicos do tumor de bexiga, ainda há, entretanto, necessidade de se encontrar meios para melhor estratificar os tumores de acordo com o seu comportamento biológico. Vários marcadores imunoistoquímicos vêm sendo estudados nos tumores de bexiga com o objetivo de encontrar alguma associação entre a expressão de um determinado marcador e o comportamento biológico tumoral.

#### **2.4.1 Marcadores Prognósticos Imunoistoquímicos**

Dentre os marcadores imunoistoquímicos, aquele que vem sendo o mais estudado é a expressão da proteína p53 mutante. O p53 é o gene que mais freqüentemente se encontra alterado nas neoplasias malignas. Como já referido anteriormente, é um gene supressor tumoral, localizado no braço curto do cromossoma 17, e tem função vital na regulação do ciclo celular. Quando há dano do DNA, a proteína p53, codificada pelo gene p53, atua reparando o DNA lesado ou provocando apoptose para que o dano celular não se propague para as células-filhas. Adicionalmente, o p53 também exerce efeito no controle da angiogênese tumoral, inibindo a produção de potentes pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos básico (*basic fibroblast growth factor*- bFGF) e estimulando a produção da trombospondina-1, fator antiangiogênico.<sup>22</sup> No entanto, se há mutação do gene p53, a proteína produzida não é funcionante, sendo, portanto, incapaz de induzir apoptose celular. Dessa forma, o defeito genético perpetua-se e desencadeia o mecanismo de carcinogênese. Diferentemente da proteína do p53 selvagem, a proteína do p53 mutado acumula-se no núcleo celular e, devido a isso, pode ser detectada por imunoistoquímica.<sup>23</sup> A expressão imunoistoquímica do p53 mutado tem sido amplamente estudada como fator

prognóstico nos tumores de bexiga e tem havido correlação com tumores mais avançados, contudo sua associação quanto à progressão e sobrevida é controversa.<sup>22</sup> Esrig e colaboradores<sup>24</sup> evidenciaram que a expressão imunohistoquímica do p53 mutado em espécimes de cistectomia foi um preditor independente de progressão e sobrevida. Dois outros estudos, de Sarkis e colaboradores<sup>25</sup> e Lipponen,<sup>26</sup> confirmaram esse achado, ou seja, que a expressão imunohistoquímica do p53, em espécimes de tumor de bexiga, foi um indicador prognóstico de progressão. Entretanto, alguns autores não identificaram associação entre expressão de p53 e pior prognóstico nos tumores de bexiga.<sup>27,28</sup> Shimitz-Dräger e colaboradores,<sup>29</sup> em uma metanálise, avaliando sete estudos a respeito da importância do p53 como fator prognóstico para progressão em neoplasia de bexiga, constataram que em somente dois estudos o p53 foi fator prognóstico independente para progressão. Sendo assim, a real importância do p53 na prática clínica ainda é assunto controverso, embora a seu papel como marcador prognóstico adverso em tumores superficiais seja provável.<sup>22</sup>

Assim como o p53, a expressão imunohistoquímica de outras proteínas reguladoras do ciclo celular também tem sido estudada em tumores de bexiga. Vários estudos têm demonstrado que a superexpressão ou não-expressão do gene retinoblastoma (RB) nos tumores de bexiga está relacionada a tumores mais agressivos e, conseqüentemente, a pior prognóstico.<sup>30,31,32</sup> Cote e colaboradores<sup>31</sup> relataram que pacientes com p53 e RB alterados apresentavam pior prognóstico do que aqueles sem alteração, no entanto, quando havia alteração em apenas um gene, o prognóstico era intermediário. Portanto, os autores concluíram que há efeito sinérgico entre os genes p53 e RB para progressão do câncer de bexiga. Chatterjee e colaboradores,<sup>33</sup> por sua vez, avaliaram a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular, p53, p21 e pRB, nos tumores de bexiga e relataram que o número de marcadores alterados (p53, p21 e pRB) estava associado de forma estatisticamente significativa ao tempo para a recorrência e ao tempo de sobrevida.

Alguns autores têm também demonstrado associação positiva entre a superexpressão imunoistoquímica do receptor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor* - EGFR) e a neoplasia de bexiga de alto grau.<sup>34,35</sup> Em estudo prospectivo, Mellon e colaboradores<sup>36</sup> avaliaram 212 pacientes com diagnóstico de câncer de bexiga e confirmaram que a expressão do EGFR foi um preditor independente para sobrevida e progressão. No entanto, Liukkonen e colaboradores<sup>37</sup> demonstraram que a expressão do EGFR foi um preditor significativo de progressão em pacientes com tumor de bexiga estágio Ta e T1 em análise univariada, mas não foi significativo na análise multivariada.

Já a expressão imunoistoquímica do HER-2/*neu* foi inicialmente estudada em espécimes de adenocarcinoma de mama. Vários estudos<sup>38,39,40</sup> têm demonstrado que a expressão do produto do HER-2/*neu* em câncer de mama é um marcador prognóstico confiável, particularmente nos pacientes com linfonodos positivos. A significância prognóstica em outras neoplasias, no entanto, não é tão evidente. Kruger e colaboradores<sup>41</sup> demonstraram que a expressão do HER-2/*neu* foi fator prognóstico independente para sobrevida câncer-específica em pacientes com câncer músculo-invasivo de bexiga em análise multivariada. Entretanto, Mellon e colaboradores,<sup>42</sup> e Jimenez e colaboradores<sup>43</sup> não encontraram diferença estatística quanto à sobrevida, entre tumores de bexiga com expressão imunoistoquímica do HER-2/*neu* e sem expressão dessa proteína.

A expressão de antígenos de proliferação nuclear, como o Ki-67, também tem sido avaliada como preditor prognóstico nos tumores de bexiga. O aumento da expressão desse antígeno indica maior atividade proliferativa das células tumorais, estando supostamente associados a tumores mais agressivos. Vários estudos têm demonstrado que a expressão do Ki-67 é um marcador prognóstico independente para progressão e recorrência dos tumores de bexiga superficiais em análise multivariada.<sup>37,44,45,46</sup> Portanto, a expressão do

Ki-67 tem sido considerada um promissor marcador de recorrência e progressão nos tumores superficiais de bexiga. Estudos prospectivos devem ser realizados para confirmar tais achados.

A expressão imunistoquímica da E-caderina, uma das principais moléculas de adesão celular, também tem sido avaliada nos tumores de bexiga. Sua reduzida expressão correlaciona-se com tumores mais agressivos e com menor sobrevida livre de recorrência.<sup>47</sup>

## **2.5 ANGIOGÊNESE TUMORAL**

A angiogênese pode ser definida como o crescimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes. Ela não é dependente de uma molécula específica, mas depende da integração e cooperação de vários fatores que desencadeiam a migração, invasão e proliferação de células endoteliais e a formação de capilares. Uma rede complexa de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos determina o equilíbrio da vascularização. Nos tecidos de adultos normais, os inibidores da angiogênese predominam. Contudo, na presença de tecidos em desenvolvimento, na cicatrização de feridas e na presença de câncer, há a predominância dos indutores da angiogênese e, por conseqüência, ocorre a neovascularização.<sup>48, 49, 50, 51</sup>

A angiogênese pode ser induzida nos tecidos pela redução na tensão tecidual de oxigênio decorrente do suprimento vascular inadequado. A proliferação descontrolada de células em qualquer órgão levará sempre a um déficit de oxigênio, uma vez que a difusão do oxigênio passa a se tornar insuficiente para a nutrição adequada das células. Dependendo do estado da vascularização do órgão afetado, o processo de hipóxia relacionado à proliferação celular tumoral pode ser atingido em fases mais precoces ou tardias.<sup>52</sup> Outros fatores também podem desencadear o fenótipo angiogênico como mutações gênicas, acidose, hipoglicemia e ativação do sistema imunológico.

A angiogênese é um processo vital para o início da progressão tumoral. Sabe-se que os tumores costumam crescer até dois a três milímetros de diâmetro sem a necessidade de neovascularização, obtendo aporte de oxigênio por difusão. No entanto, quando o tumor cresce além desse tamanho, a oxigenação tecidual realizada por difusão torna-se insuficiente, ocorrendo, por consequência, hipóxia tecidual. A hipóxia estimula fatores de crescimento e há desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos, que se ligam a receptores específicos de células endoteliais, que proliferam, migram e transformam-se em novos capilares. Portanto, o crescimento tumoral a partir de 2-3 mm é angiogênese-dependente,<sup>53</sup> e o desenvolvimento de microvasos proporciona a via de aporte de oxigênio e de nutrientes e eliminação de metabólitos (efeito de perfusão). Além disso, há também um efeito parácrino associado à angiogênese, em que células endoteliais produzem fatores de crescimento que estimulam as células tumorais.<sup>54</sup>

Estudos em autópsias têm evidenciado a presença de tumores *in situ*, especialmente tumores de mama, próstata e tireóide, em proporção significativamente grande, quando comparados com tumores francamente invasores, indicando que a disseminação sistêmica é relativamente infreqüente. Logo, acredita-se que a incapacidade dos tumores *in situ* em assumir um fenótipo angiogênico resulte na sua não-progressão para tumores invasivos.<sup>51</sup>

Já foram identificadas várias substâncias endógenas indutoras e inibidoras da angiogênese, sendo que o fator pró-angiogênico mais potente é o VEGF e o fator antiangiogênico mais importante é a trombospondina-1.<sup>55</sup> Na tabela 6 estão listados os principais fatores pró e antiangiogênicos.

**Tabela 6 - Substâncias endógenas com efeito angiogênico**

<b>Fatores pró-angiogênicos</b>	<b>Fatores antiangiogênicos</b>
Fatores de crescimento de fibroblastos	Interferon $\alpha$ e $\beta$
Fator de crescimento do endotélio vascular	Interleucina-12
Fator de crescimento derivado de plaquetas	Trombospondina-1 e 2
Prostaglandinas E-1 e E-2	Fatores derivados de cartilagem
Interleucina-8	Endostatina
Ciclooxigenase-2	Angiostatina
Fator tecidual	Vasostatina
Angiogenina	Angiopoetina 2
	Inibidor de crescimento do endotélio vascular

Crew e colaboradores<sup>56</sup> estudaram a expressão do VEGF mRNA em espécimes de carcinoma urotelial de bexiga superficial e demonstraram que a elevada expressão do VEGF estava associada a taxas mais precoces de recorrência e progressão. Suzuki e colaboradores<sup>57</sup> avaliaram a expressão imunohistoquímica do VEGF em 87 espécimes de neoplasia de bexiga, obtidas através de cistectomia, evidenciando associação significativa entre a intensidade de expressão do VEGF e comprometimento neoplásico de linfonodos pélvicos.

Outro potente fator pró-angiogênico, a angiogenina, também tem sido estudado quanto à sua associação com neoplasia de bexiga. Dois estudos identificaram que elevadas concentrações séricas de angiogenina foram associadas a uma pior sobrevida livre de recorrência.<sup>58,59</sup>

A verificação e quantificação da microcirculação tumoral tornou-se possível através de técnicas imunohistoquímicas que possibilitaram a determinação da densidade microvascular (DMV) ou do número de microvasos por campo de grande aumento. Vários estudos têm demonstrado a relação entre a DMV e a intensidade da expressão da angiogênese, assim como a relação de ambas com o crescimento tumoral e a ocorrência de metástases a distância.<sup>60</sup> Para

identificação dos microvasos, utiliza-se coloração imunoistoquímica com anticorpos que coram células endoteliais. Vários anticorpos têm sido utilizados, sendo que os mais estudados são o antiCD34, antiCD31, antifator de von Willebrand e antiCD105.<sup>61</sup> Apesar de o antiCD31 ter sido muito utilizado no passado, tem-se evidenciado reação cruzada com plasmócitos que resultam em falsos positivos, uma vez que áreas com infiltrados inflamatórios são erroneamente interpretadas como microvasos.<sup>60,61</sup> Adicionalmente, Bialas e colaboradores,<sup>62</sup> em estudo com 40 espécimes de carcinoma gástrico, relataram que na comparação entre os anticorpos antiCD31, antiCD34 e antifator de von Willebrand as preparações com o antiCD34 foram as mais fáceis de avaliar e mostraram melhor relação com a angiogênese. Devido a isso, o antiCD 34 tem sido o anticorpo mais utilizado para avaliação da DMV. O antiCD105 parece ser um marcador promissor, porém há um número menor de estudos realizados.<sup>61</sup>

A DMV pode ser determinada pela contagem dos microvasos em áreas aleatórias e obtenção de média ou através da contagem dos microvasos nas áreas de maior concentração vascular, os chamados “*hot-spots*”. Através dessa metodologia, utilizando os “*hot-spots*”, Weidner e colaboradores,<sup>63</sup> estudando pacientes com carcinoma de mama invasor, demonstraram que a DMV foi significativamente maior no grupo de pacientes que desenvolveram doença metastática e sugeriram que ela poderia ser um fator preditivo independente para o desenvolvimento de metástases a partir de neoplasias malignas de mama. A DMV também foi estudada em outros tumores, sendo correlacionada diretamente ao prognóstico nos carcinomas de pulmão<sup>64</sup> e de próstata<sup>65</sup> e ao melanoma.<sup>66</sup>

A contagem manual dos microvasos, no entanto, tem caráter subjetivo e resulta freqüentemente em variações entre observadores. Por outro lado, a captura digital das imagens e a leitura realizada em computador tornam a contagem dos microvasos mais objetiva e menos sujeita a variações.<sup>67</sup>

A DMV nos tumores de bexiga tem sido estudada e vários autores demonstraram relação entre maior DMV e pior prognóstico. Dickinson e colaboradores<sup>68</sup> foram os primeiros a descreverem correlação entre DMV e prognóstico nas neoplasias de bexiga. A DMV dos espécimes de 45 pacientes com neoplasias músculo-invasivas, obtidos por meio de ressecção endoscópica, foi avaliada, constatando-se que os pacientes com elevada DMV apresentaram mortalidade duas vezes e meia maior do que os com baixa DMV. Jaeger e colaboradores,<sup>69</sup> por sua vez, em análise de 41 tumores músculo-invasivos tratados com cistectomia radical e linfadenectomia pélvica, demonstraram mais alta DMV nos pacientes com linfonodos positivos. Bochner e colaboradores,<sup>70</sup> também estudando espécimes de cistectomias, não conseguiram demonstrar associação significativa entre DMV e estágio e grau do tumor, entretanto aqueles com elevada DMV apresentaram mais altas taxas de recorrência e menor sobrevida. Já o estudo de Philp e colaboradores<sup>71</sup> demonstrou que a DMV, em neoplasias de bexiga, é preditor de mortalidade doença-específica. Mais recentemente, Inoue e colaboradores<sup>72</sup> avaliaram espécimes de cistectomias, submetidas previamente a quimioterapia neo-adjuvante, quanto à DMV e à expressão de fatores pró-angiogênicos como o VEGF, bFGF e interleucina-8, e concluíram que a expressão do VEGF e bFGF, assim como a elevada DMV, são preditores de alto risco para desenvolvimento de metástase após quimioterapia neo-adjuvante e cistectomia radical. Por fim, Goddard e colaboradores<sup>73</sup> avaliaram a DMV apenas nos tumores superficiais de bexiga e demonstraram que aumentada DMV associava-se com progressão para tumores músculo-invasivos. Porém, Sagol e colaboradores<sup>74</sup>, que estudaram o comportamento de 80 carcinomas uroteliais de bexiga superficiais, não demonstraram diferença significativa entre aumento de microvasos e maior risco de recorrência tumoral. Cabe ressaltar que a taxa de progressão não foi avaliada. Dois estudos, no entanto, relataram que a aumentada DMV nos tumores de bexiga seria fator de bom prognóstico. Offersen e colaboradores<sup>75</sup> correlacionaram o grau de inflamação com o

aumento da DMV e demonstraram que os pacientes com elevada DMV apresentavam melhor sobrevida doença-específica. Bartoletti e colaboradores<sup>76</sup> também obtiveram resultados semelhantes e concluíram que há forte associação entre DMV maior do que 20 microvasos por campo de grande aumento e maior sobrevida, tanto nos tumores superficiais como nos tumores invasivos.

Portanto, apesar de a associação da DMV e sobrevida estar bem estabelecida em outros tumores, a sua relevância para predizer prognóstico em carcinoma urotelial de bexiga ainda é controversa, principalmente devido às características heterogêneas dessa neoplasia e também devido à falta de padronização na contagem dos microvasos.

## **2.6 FATOR TECIDUAL**

A associação entre a ocorrência de fenômenos trombo-embólicos e câncer foi descrita por Trousseau em 1865, observando que pacientes com trombo-embolismo idiopático tinham risco nove vezes maior do que a população geral de apresentarem uma neoplasia em um intervalo de até um ano. O inverso também foi observado, ou seja, indivíduos portadores de um tumor maligno têm maior probabilidade de apresentarem eventos trombo-embólicos.<sup>77</sup>

Além disso, a ocorrência de trombo-embolismo nos tumores também está relacionada ao estágio do tumor, uma vez que estudo realizado em pacientes com câncer de mama demonstrou que a incidência de eventos trombo-embólicos foi de apenas 0,1% nos pacientes no estágio I e 18% nos estágios III e IV.<sup>78</sup> Sorensen e colaboradores<sup>79</sup> também evidenciaram que pacientes com câncer e trombose venosa profunda (TVP) apresentavam estágios mais avançados e tiveram pior prognóstico quando comparados a pacientes com câncer, mas sem TVP.

Zacharski e colaboradores,<sup>80</sup> demonstraram, em estudo prospectivo randomizado, que o uso de anticoagulantes modificou favoravelmente a sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão.

Apesar das evidências que relacionam eventos trombo-embólicos e câncer, os mecanismos relacionados a tal associação somente começaram a ser desvendados recentemente. O desenvolvimento da TVP em paciente com câncer é complexo, estando relacionado a propriedades pró-coagulantes, a células endoteliais do próprio tumor e também a processos inflamatórios.<sup>77</sup> Adicionalmente, outros fatores como estase venosa, alterações vasculares e redução de fatores inibidores do processo de fibrinólise, predispõem o paciente a um estado de hipercoagulabilidade.<sup>78</sup> Por outro lado, tem-se demonstrado que o estado hipercoagulável pode favorecer o crescimento tumoral.<sup>81</sup>

Essa associação entre fenômenos trombo-embólicos e neoplasia está fortemente relacionada a uma molécula, chamada fator tecidual (FT), fundamental no desencadeamento do processo de coagulação e, por consequência, no estado de hipercoagulabilidade.<sup>82</sup>

O FT, também chamado de tromboplastina, é uma glicoproteína transmembrana, que se apresenta com uma porção extracelular, uma porção transmembrana e uma porção de domínio citoplasmático.<sup>83</sup> O FT exerce papel essencial no desencadeamento da cascata de coagulação. A sua porção extracelular interage com os fatores VII/VIIa, formando o complexo FT/FVIIa, desencadeando o processo da via extrínseca, através da ativação dos fatores IX e X, que por sua vez, são responsáveis pela conversão do fibrinogênio em fibrina, formando os coágulos sanguíneos.<sup>84</sup>

O FT também costuma estar presente em maiores concentrações na adventícia dos vasos e nos tecidos que circundam a maioria dos órgãos internos, locais onde funciona como uma verdadeira barreira hemostática. Normalmente, o FT não costuma ser expresso no

endotélio. No entanto, a ocorrência de lesão vascular pode induzir a sua expressão nesses tecidos.<sup>85</sup>

O FT desempenha, ainda, funções distintas daquelas relacionadas à coagulação, e acredita-se que seja uma molécula importante para a sinalização e proliferação celular, bem como para a formação de vasos sanguíneos.<sup>86</sup>

O FT exerce, igualmente, papel importante no desenvolvimento embrionário, pois, nessa fase, a barreira placentária impede a passagem de fatores de coagulação maternos e, portanto, o FT torna-se de vital importância para o desenvolvimento vascular. A sua expressão é identificada em tecidos embrionários como cardiomiócitos, células epiteliais, células do endoderma visceral, músculo liso vascular e tecido neural. Carmeliet e colaboradores,<sup>87</sup> em estudo experimental, inativaram o gene do FT e demonstraram que a sua deficiência inviabiliza o desenvolvimento de embriões devido ao desenvolvimento incompleto da camada peri-endotelial da parede vascular e alterações no desenvolvimento do saco vitelino.

A expressão do FT pode também ser induzida por uma série de outras situações como pela liberação do fator de necrose tumoral, do VEGF e do fator de crescimento de fibroblastos.<sup>87</sup> Além disso, o FT também desempenha papel importante em uma série de condições patológicas como a coagulação intravascular na sepse,<sup>88</sup> arteriosclerose<sup>89</sup> e câncer.<sup>82</sup>

A associação entre alta expressão imunoistoquímica do FT e pior prognóstico de tumores malignos já foi descrita nas neoplasias de mama,<sup>90</sup> pâncreas,<sup>91</sup> pulmão,<sup>92</sup> gliomas,<sup>93</sup> próstata,<sup>94</sup> e cólon.<sup>95</sup> Segundo vários autores,<sup>82,96,97,98</sup> o FT desempenha papel fundamental na fisiopatologia do câncer devido à sua capacidade de induzir a expressão do VEGF e criar uma proliferação vascular tumoral exagerada. O maior aporte sanguíneo, por sua vez, propicia o desenvolvimento tumoral e metastático. Portanto, o FT estimula a expressão do VEGF,

potente fator pró-angiogênico, e inibe a produção da trombospondina-1, importante fator antiangiogênico, acarretando desequilíbrio na angiogênese e, por consequência, o desenvolvimento de novos vasos.<sup>82</sup>

O estímulo pró-angiogênico do FT pode ocorrer através de duas vias fisiopatológicas distintas: uma, dependente da coagulação; e outra, não dependente. A via coagulação-dependente é desencadeada pela ligação do FT ao fator VII e formação do complexo FT/FVIIa, resultando na ativação da trombina. Esta é responsável pela lise dos fibrinopeptídeos A e B a partir da molécula de fibrinogênio, determinando a sua conversão em fibrina e elevação nas concentrações do fibrinopeptídeo A que, por sua vez, foram correlacionadas à progressão e crescimento tumoral. A trombina também promove a ativação de plaquetas, as quais se unem à fibrina, formam o coágulo e liberam fatores pró-angiogênicos, dentre eles o VEGF, que contribuem para a migração e a proliferação de células endoteliais. O VEGF ainda induz ao aumento da permeabilidade vascular que determina escape de proteínas plasmáticas, especialmente a fibrina, as quais formarão uma matriz ao redor das células tumorais. Essa matriz serve como base para migração de células endoteliais e para a angiogênese tumoral.<sup>82,99</sup>

A via não dependente da coagulação é desencadeada pela fosforilação da porção citoplasmática do FT, induzindo a formação de uma seqüência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes, entre eles o VEGF, resultando em um potente estímulo angiogênico.<sup>82,98</sup>

Há uma molécula chamada inibidor da via do fator tecidual (*tissue factor pathway inhibitor* - TFPI), com a capacidade de bloquear as ações do FT. Na cascata de coagulação, o TFPI inibe os fatores FT, FVIIa e o fator Xa formando um complexo quartenário inibitório. Adicionalmente, o TFPI exerce atividade antiangiogênica e antitumoral por meio de bloqueio da sinalização celular.<sup>100</sup> As heparinas estimulam a liberação do TFPI pelas células endoteliais

e conseqüentemente atuam bloqueando a atividade do FT. Isso pode ter implicações clínicas importantes no sistema de coagulação, reduzindo o estado hipercoagulável dos pacientes com câncer e potencialmente retardando a progressão das neoplasias, com eventual melhora da sobrevida.<sup>101</sup>

Portanto, o FT tem importante papel no desenvolvimento do fenótipo angiogênico em determinados tumores, assim como na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases.<sup>102</sup> Em virtude disso, vários trabalhos têm sido realizados para comprovar a ação do FT na angiogênese tumoral.

Zhang e colaboradores<sup>103</sup> avaliaram, em estudo experimental, o efeito do FT na angiogênese em sarcomas de camundongos. As células de sarcoma Meth A, transfectadas com inibição da expressão do FT, revelaram redução em seu crescimento e vascularização. As células que expressavam o FT, ao contrário, demonstraram crescimento e vascularização exuberante, mediados, em parte, pela produção do VEGF e pela inibição da trombospondina-1.

Rickles e colaboradores<sup>104</sup> também identificaram forte correlação entre a expressão do FT e o VEGF. Em estudo experimental, células neoplásicas foram inoculadas em camundongos. Em um grupo, foi transfectada a seqüência completa de FT, e as células tumorais produziram FT e VEGF. No outro grupo, foi transfectado o FT com alterações na porção citoplasmática e não houve a produção de VEGF. Foi demonstrado, portanto, que a porção citoplasmática do FT é fundamental para a produção do VEGF, mediado pelo FT.

A porção extracelular do FT, por outro lado, parece ter influência na disseminação dos tumores malignos. Mueller e Ruf<sup>105</sup> demonstraram, através de modelo experimental, o papel do complexo FT-FVIIa no desenvolvimento das metástases. Aparentemente, a atividade extracelular do complexo FT-FVIIa atua em cooperação com a porção de domínio citoplasmático do FT para o processo de disseminação hematogênica do tumor.

Também foi estudado, por Amirkhosravi e colaboradores,<sup>106</sup> a importância da hipóxia no aumento da expressão imunistoquímica do FT em tecidos tumorais. Experimento com cultura de células de vários tipos de tumores, em meios com baixa tensão de oxigênio, demonstrou aumento da atividade pró-coagulante e da expressão do FT. Adicionalmente, a inoculação dessas células tumorais em cobaias resultou no aparecimento de metástases pulmonares mais frequentemente do que nas células cultivadas com níveis normais de oxigênio. Os autores concluíram, portanto, que a hipóxia aumenta a expressão do FT nas neoplasias malignas, facilitando o desenvolvimento de metástases hematogênicas, através de um mecanismo mais associado à atividade coagulante do FT.

Diante das evidências que demonstram a ação do FT na indução da produção de VEGF e, por consequência, sua ação pró-angiogênica, surgiram estudos clínicos avaliando a expressão imunistoquímica do FT em determinados tumores e sua possível relação com o comportamento biológico das neoplasias malignas

Hamada e colaboradores<sup>93</sup> avaliaram a expressão imunistoquímica do FT em gliomas e correlacionaram-na com o seu grau histológico, ocorrendo expressão do FT em apenas 10% dos gliomas de baixo grau (graus I e II), e intensa ou moderada expressão do FT em 86% dos astrocitomas anaplásicos (grau III) e 95% dos glioblastomas (grau IV). Portanto, a expressão do FT correlacionou-se fortemente com tumores pouco diferenciados.

Contrino e colaboradores<sup>107</sup> descreveram a associação entre a maior expressão imunistoquímica do FT e tumores mais agressivos em câncer de mama. Também Vrana e colaboradores<sup>90</sup> identificaram correlação positiva entre a expressão imunistoquímica do FT e a progressão em carcinoma de mama invasivo.

Seto e colaboradores<sup>95</sup> estudaram a expressão imunistoquímica do FT em 67 espécimes de carcinoma colo-retal, classificando-a em quatro categorias (ausente, pouca, moderada e alta expressão). Os autores verificaram maior incidência de metástases hepáticas e

pior sobrevida nos tumores com moderada/alta expressão de FT. Nakasaki e colaboradores<sup>108</sup> também avaliaram a expressão imunoistoquímica do FT nos tumores malignos colo-retais, demonstrando que sua intensidade de expressão correlacionava-se com o estadiamento pela classificação de Dukes. Adicionalmente, observou-se significativa correlação entre a expressão do FT e do VEGF.

Kakar e colaboradores<sup>91</sup> avaliaram a expressão imunoistoquímica do FT nos carcinomas ductais de pâncreas e observaram que os tumores pouco diferenciados apresentaram elevada expressão do FT.

Koomagi e colaboradores<sup>92</sup> estudaram a expressão imunoistoquímica do FT em espécimes de carcinoma de pulmão não-avenocelular, identificando correlação significativa entre expressão do FT e DMV. A expressão do FT associou-se também à pior sobrevida e à maior expressão do VEGF.

A associação entre expressão imunoistoquímica do FT e neoplasias urológicas também vem sendo relatada. Abdulkhadir e colaboradores<sup>94</sup> estudaram espécimes de 67 pacientes com diagnóstico de câncer de próstata clinicamente localizado e que foram submetidos à prostatectomia radical. Em 73% dos espécimes examinados, houve expressão imunoistoquímica do FT. Foi demonstrada também associação direta entre expressão do FT e níveis mais elevados do antígeno prostático específico (*prostatic specific antigen* - PSA), reconhecido marcador prognóstico nessa neoplasia. Além disso, foi observado que espécimes com expressão aumentada de FT apresentavam níveis mais elevados de DMV. Akashi e colaboradores<sup>109</sup> avaliaram 73 pacientes com câncer de próstata metastático e identificaram alta expressão imunoistoquímica de FT em 75% das espécimes. Adicionalmente, a elevada expressão do FT foi um fator preditor de pior resposta ao tratamento com deprivação androgênica.

A expressão imunoistoquímica do FT nos espécimes de neoplasia de bexiga não é relatada na literatura, exceto pelo trabalho de Patry e colaboradores.<sup>110</sup> Nesse único estudo, ainda não impresso, os autores avaliaram a expressão imunoistoquímica do FT nos espécimes de 218 pacientes submetidos a cistectomia e com diagnóstico de neoplasia de bexiga músculo-invasiva. O FT foi expresso em 77,6% dos tumores, independente de estágio e grau. No grupo de pacientes com linfonodos negativos, aqueles que apresentavam expressão imunoistoquímica do FT tiveram menor sobrevida câncer-específica. Portanto, os autores concluíram que a expressão imunoistoquímica do FT foi um preditor independente para sobrevida doença-específica em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga músculo-invasivo, mas com linfonodos negativos, tratados com cistectomia, podendo identificar pacientes com alto risco de progressão da doença.

Além da expressão imunoistoquímica do FT nos espécimes, alguns autores têm estudado a concentração desse marcador na urina e no sangue. Adamson e colaboradores<sup>111</sup> dosaram os níveis de FT na urina de pacientes com tumores de bexiga e compararam-nos com o FT urinário de pacientes com hiperplasia prostática benigna e de indivíduos hígidos. Constataram que o FT urinário dos pacientes com neoplasia de bexiga foi mais elevado do que o dos grupos controles, no entanto não foi possível diferenciar, por meio desse método, tumores superficiais de tumores músculo-invasivos. Lwaleed e colaboradores<sup>112</sup> avaliaram a concentração urinária de FT em pacientes com tumores de bexiga e de próstata e compararam os resultados com níveis urinários em voluntários hígidos e em pacientes com doenças urológicas benignas como hiperplasia prostática benigna, urolitíase, cistite e prostatite. Nos pacientes com neoplasia de bexiga, o nível de FT urinário foi estatisticamente mais elevado que os controles, o que não ocorreu com os pacientes com neoplasia de próstata. Além disso, os níveis de FT, nos pacientes com neoplasia de bexiga, correlacionaram-se com o grau histológico do tumor. Por fim, Föster e colaboradores<sup>102</sup> investigaram, através do teste de

ELISA, a expressão do FT nos espécimes e no sangue de pacientes com carcinoma de células renais (CCR), carcinoma urotelial de bexiga e adenocarcinoma de próstata. Nos espécimes, o FT foi quantificado no tecido tumoral e no tecido não-tumoral adjacente ao tumor. Nos três tipos de tumor estudados, a concentração de FT no tecido tumoral foi menor que no tecido não-tumoral. Portanto, a quantificação do FT em espécimes não teve valor quando utilizado através do teste de ELISA. Da mesma forma, também não foi demonstrado aumento dos níveis séricos de FT no adenocarcinoma de próstata e CCR, quando comparados aos níveis séricos de voluntários hígidos. Contudo, os níveis séricos de FT nos pacientes com carcinoma urotelial de bexiga foram significativamente aumentados quando comparados com os controles.

Em suma, a interação entre FT e neoplasia de bexiga é tema muito pouco explorado pelos centros de pesquisa. Logo, faz-se necessária a identificação da expressão do FT em espécimes de carcinoma urotelial, obtidas por meio de ressecção endoscópica de tumor vesical, pois tal estudo, além de nunca ter sido descrito na literatura, poderá contribuir, no futuro, para que surja um novo marcador prognóstico para essa neoplasia.

### **3 OBJETIVOS**

- 1- Descrever a expressão do fator tecidual em espécimes de carcinoma urotelial de bexiga obtidos por meio de ressecção endoscópica de tumor vesical;
  
- 2- Correlacionar a intensidade de expressão do fator tecidual com grau, estágio, densidade microvascular e sobrevida;
  
- 3- Correlacionar a densidade microvascular com grau, estágio e sobrevida.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO E AMOSTRA

Para realização do presente trabalho, foi efetuado estudo retrospectivo de coorte histórico, em que foram avaliados 67 pacientes com carcinoma urotelial de bexiga submetidos à ressecção endoscópica de tumor vesical no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS), no período correspondente a setembro de 1994 e julho de 2003.

O material ressecado foi examinado pelo Serviço de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS e classificado quanto a diagnóstico histopatológico, estágio e grau. Os tumores foram classificados quanto à profundidade de penetração na parede (estágio patológico) em *carcinoma in situ*, Ta, T1 e T2, e, quanto ao grau de diferenciação celular, em Graus 1, 2 e 3, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde. Nos pacientes submetidos a mais de uma ressecção endoscópica de tumor vesical, somente o material do primeiro procedimento foi considerado para análise.

Os blocos de parafina com os espécimes da amostra foram cortados e corados com hematoxilina-eosina (HE) e reexaminados por dois patologistas experientes para avaliação quanto à representatividade da neoplasia no corte e, para confirmação dos achados, quanto ao estágio patológico e grau. Além disso, foram utilizados cortes adjacentes aos avaliados por HE para realização de análise imunoistoquímica e conseqüente aferição da densidade microvascular e expressão do fator tecidual.

Também foi realizada revisão dos prontuários dos pacientes da amostra para completar banco de dados. Sempre que os dados do prontuário foram insuficientes, tentou-se

contato telefônico ou por correspondência com o paciente ou com um familiar, para a obtenção das informações necessárias.

#### **4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram incluídos os pacientes submetidos à ressecção endoscópica de carcinoma urotelial de bexiga no Serviço de Urologia do Hospital São Lucas da PUCRS, no período já referido anteriormente.

#### **4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos do estudo todos os pacientes que apresentaram uma ou mais das condições abaixo:

- pacientes cuja primeira ressecção endoscópica de tumor vesical não foi realizada no Hospital São Lucas da PUCRS;

- espécimes de anatomia patológica sem condições para as análises histológicas apropriadas;

- pacientes submetidos à radioterapia ou quimioterapia previamente à ressecção endoscópica do tumor.

#### 4.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis analisadas em relação à expressão do fator tecidual e à densidade microvascular foram:

- idade;
- sexo;
- estágio patológico do tumor(T);
- grau de diferenciação celular;
- sobrevida.

#### 4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

A partir dos tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina das peças tumorais selecionadas, cortes com espessura de 3 µm foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20 mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito utilizando-se solução de peridrol a 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em solução salina a 5% em tampão PBS (“*phosphate buffered saline*”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (*background*). As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato antifator tecidual humano tipo 1 (Mouse anti-human tissue factor, type 1 US Biological – type Mab, IgG1 clone 2K1) com diluição de 1:30 e, anticorpo monoclonal de rato antiCD34 (CD34 classe II, Clone QBEnd 10 Dakocytomation) com diluição de 1:400. O sistema de detecção utilizado foi o Kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os cortes foram revelados, usando-se cromógeno 3,3`- diaminobenzidina (DAB) e tampão PBS em solução

a 0,002% de peróxido de hidrogênio e contracorados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e, finalmente, montados com bálsamo e lamínula.

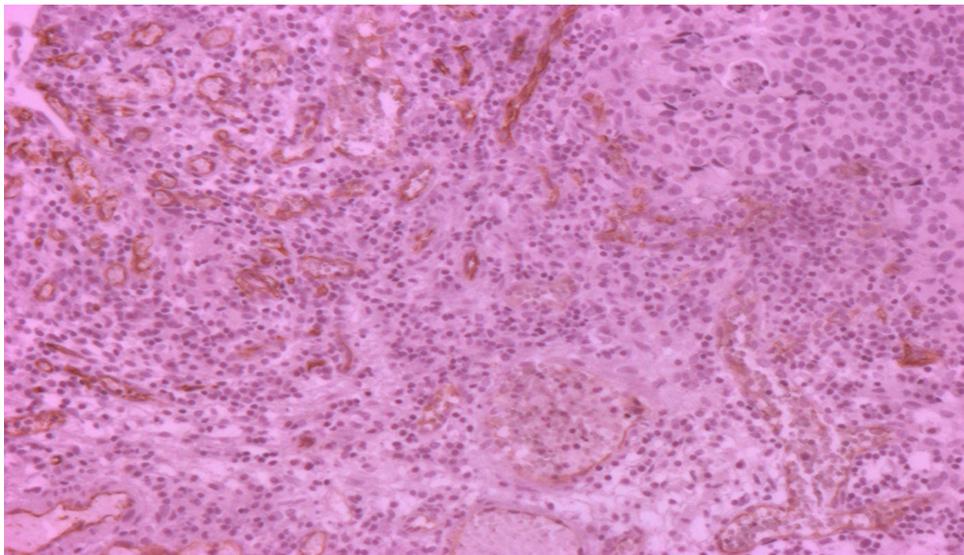
#### **4.6 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS**

O sistema de análise digital utilizado foi composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de videocâmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture kit (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Para a análise digital das imagens, foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5. Esse programa permite a captura da imagem digital com a possibilidade de inserção de grade de correção, marcação e contagem das áreas de interesse. As imagens foram capturadas no formato TIFF (True Image Format File). O processo de captura das imagens foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS.

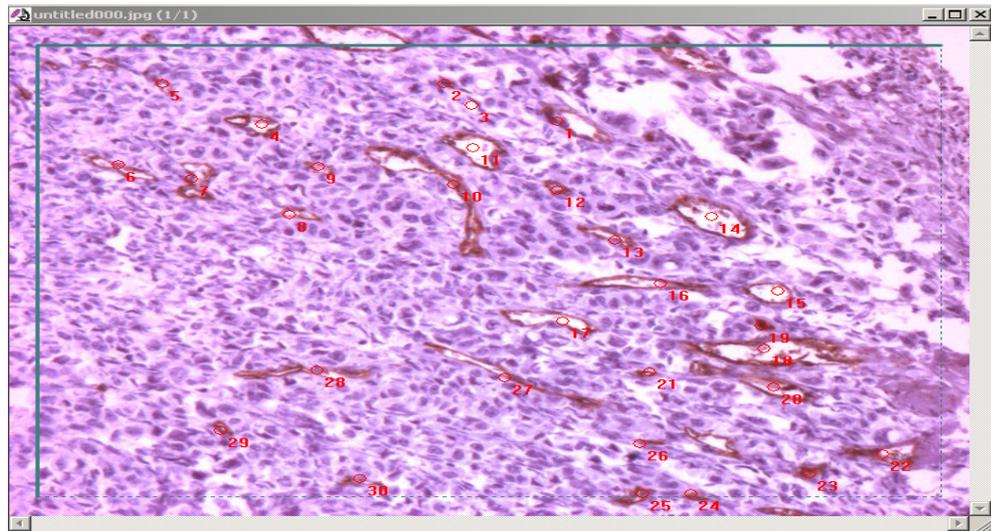
#### **4.7 DENSIDADE MICROVASCULAR**

A contagem dos microvasos foi realizada em secções de tecido neoplásico dos blocos de parafina, em cortes imediatamente adjacentes aos usados para identificação da área tumoral e dos usados para avaliação do fator tecidual. A identificação da microvascularização foi realizada por meio da seleção dos pontos mais vascularizados, examinada com magnificação baixa (50X). Essas áreas hipervascularizadas, denominadas “*hot spots*”, são representativas dos locais de maior densidade microvascular. Após a sua identificação, foi realizada a captura da imagem em dez campos diferentes para a contagem dos vasos com magnificação de 100X (1312X1040 pixels) correspondendo à área de 0,76 mm<sup>2</sup>. Os

microvasos foram identificados pela coloração acastanhada, em contraste ao fundo de cor azul claro (figura 1). Todas as células endoteliais coradas, separadas de microvasos adjacentes, foram contadas como um vaso, não sendo necessário a identificação de luz vascular. Tanto células isoladas quanto vasos maiores foram incluídos na contagem. A inserção de uma grade de correção resultou em campo com amplitude de 1312X960 pixels, correspondendo à área de 0,66 mm<sup>2</sup>. Somente foram contados os vasos que se encontravam dentro da área da grade ou que tocavam a linha de demarcação pontilhada (figura 2) como preconizado por Gundersen e colaboradores.<sup>113</sup> A contagem foi realizada em escala ordinal e, posteriormente, foi realizada a média aritmética dos campos selecionados em cada paciente.



**Figura 1- Coloração de microvasos (marrom) por anticorpos antiCD 34 em secção tumoral (magnificação de 100X).**



**Figura 2 - Imagem obtida no programa após a inserção de grades de correção para contagem dos microvasos (magnificação de 400X).**

#### **4.8 EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL**

A quantificação da expressão do FT foi avaliada de forma independente por dois observadores treinados quanto à reatividade para o anticorpo, utilizando-se, para aferição, lente objetiva com magnificação de 100x. A expressão do FT foi classificada em quatro categorias:

1. Zero a 25% das células com carcinoma coradas;
2. Vinte e seis a 50% das células com carcinoma coradas;
3. Cinquenta e um a 75% das células com carcinoma coradas;
4. Setenta e seis a 100% das células com carcinoma coradas.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão. Na situação de assimetria, tais descritores foram complementados por mediana, mínimo e máximo. A avaliação da relação entre a densidade microvascular e os níveis de expressão do fator

tecidual foi feita por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson, seguido da técnica de regressão linear. Foram comparadas as características clínico-patológicas entre os pacientes acima e abaixo da mediana de DMV, e entre os pacientes com baixa e alta expressão de FT pelo testes t de Student para amostras independentes (variáveis quantitativas) ou pelos testes de Qui quadrado com correção de Yates, teste Exato de Fisher ou teste de Qui quadrado (variáveis categóricas).

Adicionalmente, os grupos (determinados pelo fator tecidual) foram comparados em modelo de ANOVA (análise de variância) e ANCOVA (análise de covariância) para o ajuste do potencial efeito da idade como fator de confusão. A mortalidade foi estudada pela técnica de Kaplan- Meier e confirmada em modelo de regressão de azares proporcionais de Cox. Os dados foram processados e analisados com auxílio dos programas Excel e SPSS versão 12.0 para Windows. O nível de significância adotado foi de  $\alpha= 0,05$ .

#### **4.10 ÉTICA**

Este estudo encontra-se em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Protocolo nº 04/02139

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Foram analisados os dados anátomo-patológicos e sobrevida global dos 67 pacientes incluídos no estudo. Nessa população, a média de idade foi de 65,42 (DP  $\pm$  1,99) anos, sendo 51 (76,1%) indivíduos do sexo masculino e 16 (23,9%) do sexo feminino. Quanto ao estágio patológico, avaliando a penetração do tumor na parede vesical (T), 41 (61,1%) pacientes eram Ta, seis (9,0%) pacientes eram T1 e 20 (29,9%) pacientes eram T2. Nenhum caso de carcinoma *in situ* foi descrito na amostra. Segundo a classificação da OMS, avaliando o grau de diferenciação celular, 30 (44,8%) pacientes eram grau 1 (G1), 15 (22,4%) pacientes eram grau 2 (G2) e 22 (32,8%) eram grau 3 (G3). (Tabela 7)

**Tabela 7 - Características clínicas e patológicas da população estudada (n = 67)**

Média de idade [ $\pm$ DP] quando da operação(anos)	65,42 [1,99]
Sexo (masculino: feminino)	3,1:1
Estágio	
Ta	41 (61,1%)
T1	6 (9,0%)
T2	20 (29,9%)
Grau	
G1	30 (44,8%)
G2	15 (22,4%)
G3	22 (32,8%)

Dos 67 pacientes estudados, 51 (76,1%) apresentavam seguimento com dados passíveis de utilização para análise da sobrevida e da mortalidade global. O tempo médio de seguimento foi de 53,6 (DP $\pm$  40,45) meses.

## 5.2 DENSIDADE MICROVASCULAR

O número de microvasos por campo variou entre 4,8 e 61,6, sendo a DMV média de 23 ( $\pm 12,09$ ). A mediana da DMV foi de 20 microvasos por campo, sendo este valor utilizado como ponto de corte para divisão em dois grupos, com maior e menor vascularização. Foi avaliada a correlação entre o número de microvasos e as principais variáveis do estudo como idade, sexo, estágio e grau. Não houve correlação estatisticamente significativa e os dados estão descritos na tabela 8.

**Tabela 8 - Correlação entre as características clínico-patológicas e DMV**

Variável		DMV<20 (n=32)	DMV $\geq$ 20 (n=35)	P*
Idade (anos), média $\pm$ DP		66,9 $\pm$ 12,6	64,0 $\pm$ 11,4	0,33
Sexo masculino, n(%)		22 (68,8)	29 (82,9)	0,29
Grau de diferenciação celular, n(%)	1	16 (50,0)	14 (40,0)	0,67
	2	7 (21,9)	8 (22,9)	
	3	9 (28,1)	13 (37,1)	
Estágio, n(%)	Ta	21 (65,6)	20 (57,2)	0,68
	T1	2 (6,3)	4 (11,4)	
	T2	9 (28,1)	11 (31,4)	

\*P; significância estatística obtida pelo teste t de Student para amostras independentes para as variáveis quantitativas e pelo teste de Qui quadrado com correção de Yates ou teste de Qui quadrado para variáveis categóricas.

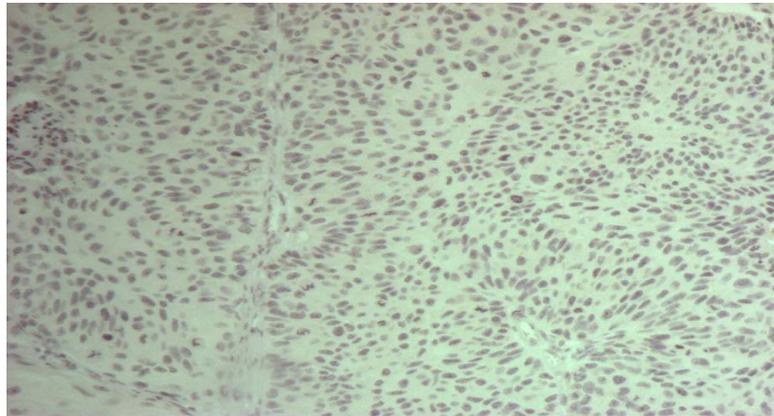
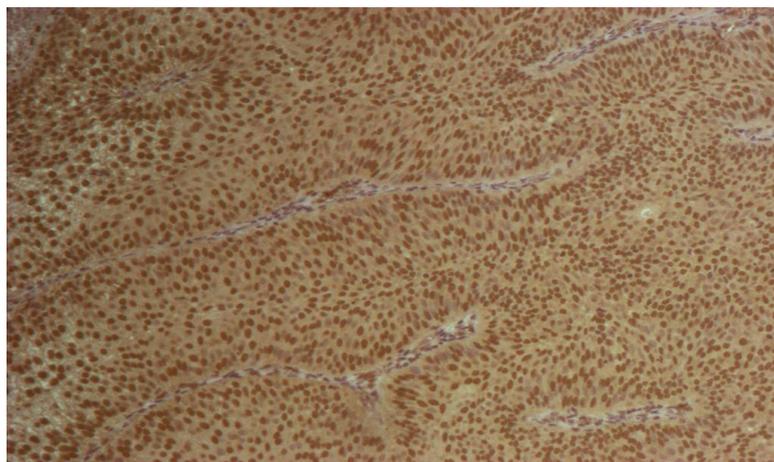
## 5.3 EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL

A expressão do fator tecidual, como já referido anteriormente, foi classificada de acordo com a intensidade de expressão da proteína no espécime, conforme demonstrado na tabela 9.

**Tabela 9 - Expressão do fator tecidual em espécimes de carcinoma urotelial de bexiga**

Categoria Fator Tecidual	Número de amostras (%)
1 (0-25%)	16 (23,9)
2 (26-50%)	11 (16,4)
3 (51-75%)	33 (49,3)
4 (76-100%)	7 (10,4)

As figuras 3 e 4 representam, respectivamente, a expressão do FT nas categorias 1 e 4.

**Figura 3 - Expressão de FT categoria 1 ( 0-25%)****Figura 4 - Expressão de FT categoria 4 (76-100%)**

Para a análise estatística, a expressão de FT foi reagrupada em apenas dois grupos: baixa expressão de FT (escore 1) e moderada/alta expressão de FT (escores 2, 3, 4), e foram examinadas as correlações entre as categorias de expressão do FT e os indicadores prognósticos conhecidos para carcinoma urotelial de bexiga como penetração do tumor na parede vesical (T) e grau de diferenciação celular do tumor. Não foi identificada diferença estatística entre os grupos de expressão de FT e tais indicadores, conforme demonstrado na tabela 10.

**Tabela 10 - Correlação entre as características clínico-patológicas e expressão de FT**

Variável		Expressão baixa FT (n=16)	Expressão moderada/ alta FT (n=51)	P*
Idade anos, média±DP		64,3±12,4	65,8±12,0	0,66
Sexo masculino, n(%)		10 (62,5)	41 (80,4)	0,18
Grau de diferenciação celular, n(%)	1	7 (43,7)	23 (45,1)	0,87
	2	3 (18,8)	12 (23,5)	
	3	6 (37,5)	16 (31,4)	
Estágio, n(%)	Ta	10 (62,5)	31 (60,8)	0,91
	T1	1 (6,2)	5 (9,8)	
	T2	5 (31,3)	15 (29,4)	

\*P; significância estatística obtida pelo teste t de Student para amostras independentes para as variáveis quantitativas e pelo teste Exato de Fisher ou teste de Qui quadrado para variáveis categóricas.

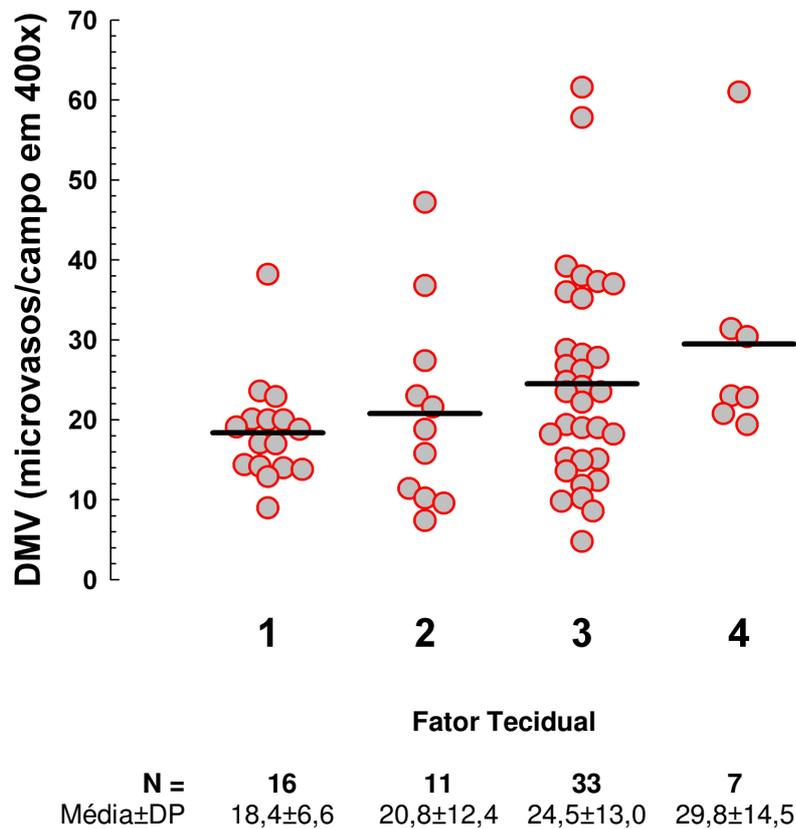
#### **5.4 RELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL E DENSIDADE MICROVASCULAR**

Com a finalidade de quantificar se alterações na regulação da expressão do FT nas células tumorais afetam o seu comportamento angiogênico, foi avaliada a relação entre as categorias do fator tecidual e o densidade microvascular nos espécimes de carcinoma urotelial de bexiga. Foi observada correlação estatisticamente significativa entre a expressão do fator tecidual e a maior densidade microvascular ( $p=0,022$ ; Tabela 11 e Figura 5).

**Tabela 11 - Relação entre o fator tecidual e a densidade microvascular em carcinoma urotelial de bexiga**

Densidade Microvascular (microvasos/campo em 100x)	Fator Tecidual				P*
	1 n = 16	2 n = 11	3 n = 33	4 n = 7	
média (DP)	18,4 (6,6)	20,8 (12,4)	24,5 (13,0)	29,8 (14,5)	0,022
mediana (mínimo a máximo)	18,0 (9 a 38,2)	18,8 (7,4 a 47,2)	23,5 (4,8 a 61,6)	23,0 (19,8 a 61,0)	

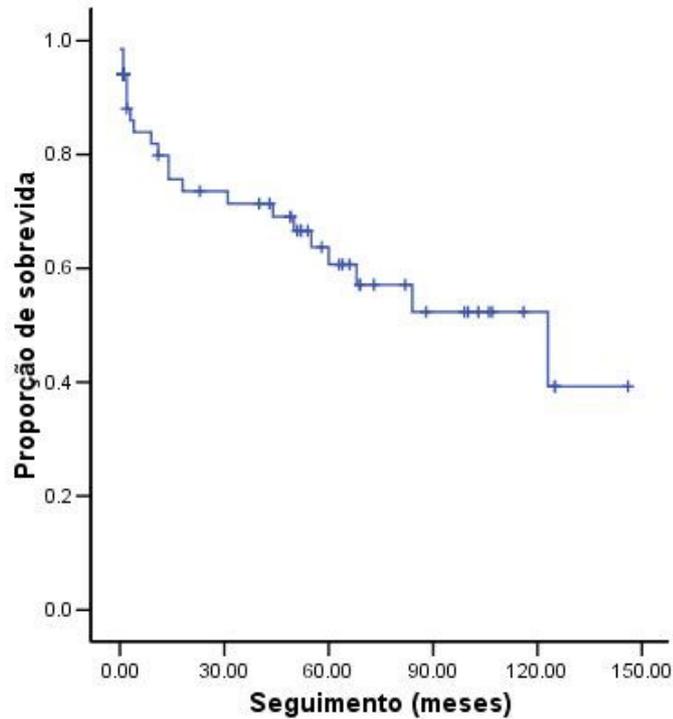
\*P: significância estatística obtida em modelo de regressão linear tomando o fator tecidual como variável preditora e a densidade microvascular como desfecho ( $r = 0,28$ ;  $P = 0,022$  e  $r_s = 0,30$ ;  $P = 0,014$ )



**Figura 5 - Densidade microvascular (DMV) segundo categorias do fator tecidual em carcinoma urotelial de bexiga**

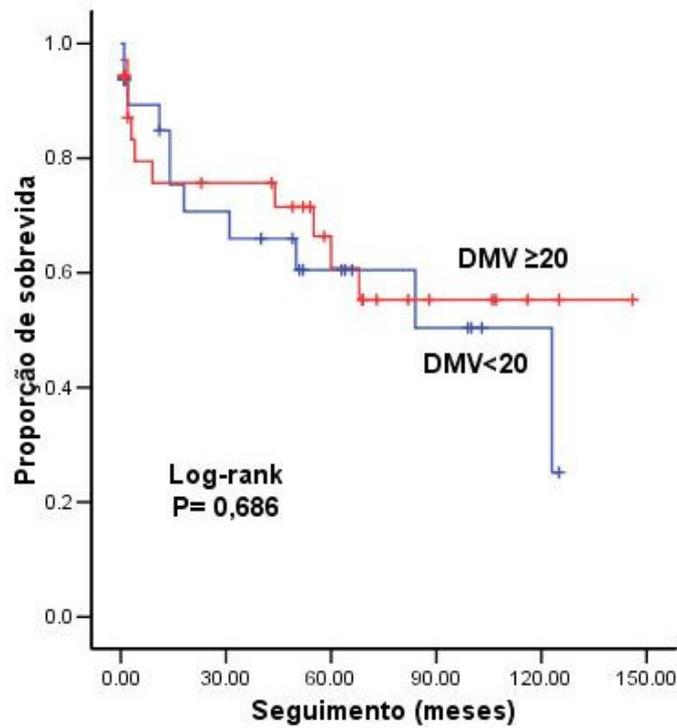
## 5.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA

O seguimento foi avaliado em 51 pacientes (76,11%) e o seu tempo médio foi de 53,6 meses, com variação de zero a 146 meses. A curva de sobrevida geral dos pacientes está demonstrada na figura 6.



**Figura 6 - Curva de sobrevida geral dos pacientes.**

Foi realizado gráfico de sobrevida, analisado pelo método de Kaplan-Meier, para comparar os pacientes com baixa e alta DMV e, utilizando o teste Log-rank, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,68$ ), conforme demonstrado na figura 7.



**Figura 7 - Gráfico de sobrevivência (método de Kaplan-Meier) entre grupos com baixa (<20 microvasos/campo) e alta ( $\geq 20$  microvasos / campo) densidade microvascular.**

No entanto, o gráfico de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier, comparando os pacientes com baixa expressão do FT ( $\leq 25\%$ ) e moderada/alta expressão de FT ( $>25\%$ ) está demonstrado na figura 8 e, por meio do teste Log-rank, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa ( $p=0,029$ ).

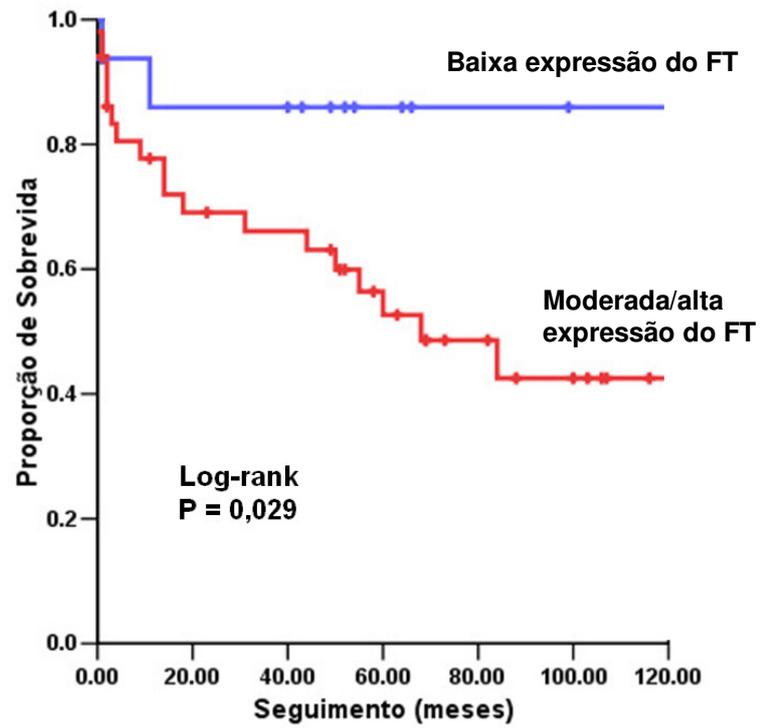


Figura 8 - Gráfico de sobrevida (método de Kaplan-Meier) entre grupos de baixa expressão do fator tecidual ou moderada/alta expressão.

## 6 DISCUSSÃO

A neoplasia de bexiga é uma doença que apresenta comportamento biológico heterogêneo, dependendo do seu estágio patológico, do grau de diferenciação celular, da presença de carcinoma *in situ* associado e de outros fatores ainda não bem estabelecidos.

Há grande interesse dos centros de pesquisa na identificação de marcadores prognósticos que possam melhor caracterizar a agressividade e prognóstico dos tumores de bexiga, uma vez que cerca de 15% dos tumores não-invasivos irão progredir para um tumor músculo-invasivo, e mesmo tumores invasivos apresentam agressividade e resposta a tratamento sistêmico diferente.

O presente estudo avaliou, além do estágio local (T) e grau, dois fatores preditivos imunohistoquímicos, a DMV e o FT, em espécimes de carcinoma urotelial de bexiga, obtidos a partir de ressecções endoscópicas de tumor vesical.

Quanto ao estágio patológico, identificaram-se apenas tumores Ta, T1 e T2 e a frequência dos estágios foi semelhante aos achados da literatura. Nenhum espécime, no entanto, foi classificado como carcinoma *in situ* (Tis), T3 e T4. A justificativa para tal achado pode compreender o fato do estudo ter sido realizado a partir de espécimes de ressecção endoscópica de tumor vesical, e não de espécimes de biópsias a frio (mais utilizadas em casos de citologia positiva e suspeita de carcinoma *in situ*). Já os tumores T3 e T4 costumam ser diagnosticados somente em espécimes de cistectomia, o que explica a inexistência desses achados em nossa série. Como a presença de carcinoma *in situ* associado ao tumor também é considerado um critério de pior prognóstico, reconhecemos que a sua não avaliação, devido à inexistência desse achado na nossa amostra, pode ser uma limitação do nosso estudo.

A respeito do grau de diferenciação celular, apesar de haver uma tendência à utilização da nova classificação da OMS<sup>19</sup> de 2004, o presente estudo empregou a classificação da OMS, publicada por Mostofi<sup>18</sup> em 1973, uma vez que se trata de estudo retrospectivo e a nova classificação foi publicada posteriormente à análise dos espécimes da amostra.

A distribuição dos tumores da amostra estudada quanto ao grau difere da relatada na literatura. Os tumores G2 predominam na maioria dos estudos, enquanto em nossos dados, a classificação quanto ao grau demonstrou distribuição homogênea. A atribuição do grau de diferenciação sabidamente apresenta uma variabilidade grande de acordo com os critérios do patologista que examina o caso.<sup>21</sup> Talvez esse fato tenha contribuído para uma distribuição mais homogênea no grau tumoral em nossa casuística.

O predomínio de fatores pró-angiogênicos sobre os fatores antiangiogênicos, determinando o fenótipo angiogênico, tem sido frequentemente associado a neoplasias de pior prognóstico. No entanto, nem sempre esta associação é verificada. A grande dificuldade, aparentemente, tem sido a quantificação da angiogênese tumoral, pois ainda não existem estudos prospectivos que determinem o método de aferição mais adequado à finalidade de evitar variações na avaliação subjetiva por observadores diferentes. A partir do estudo de Weidner e colaboradores,<sup>65</sup> tem havido uma tendência à utilização da análise imunoistoquímica da DMV como método de quantificação da angiogênese. No entanto, devido aos critérios imprecisos de aferição, tem sido verificada uma ampla variação de resultados entre os estudos que quantificaram a DMV na literatura. O controle de qualidade na seleção do material, seu processamento, realização adequada da imunoistoquímica, seleção da área a ser avaliada e técnica de avaliação da DMV são fundamentais para a comparação e a reprodutibilidade dos diferentes estudos em angiogênese.

A validade da aferição da DMV nos tumores de bexiga e sua associação com prognóstico têm sido controversa e os achados na literatura a respeito da associação entre estágio, grau e sobrevida, e DMV nos tumores de bexiga são os mais variados. Dickinson e colaboradores,<sup>68</sup> avaliando espécimes de ressecção endoscópica de tumor vesical, não encontraram associação entre DMV e estágio e grau, mas os pacientes com DMV aumentada tiveram mortalidade duas vezes e meia maior. Sagol e colaboradores<sup>74</sup> encontraram associação entre DMV e grau, mas não identificaram associação entre DMV e estágio. Bochner e colaboradores,<sup>70</sup> estudando espécimes de cistectomia, e Philp e colaboradores,<sup>71</sup> avaliando tumores obtidos de ressecção endoscópica, encontraram associação entre DMV aumentada e estágio patológico. Outros dois estudos recentes, no entanto, constataram que o aumento da DMV estava associado a pacientes com maior sobrevida.<sup>75,76</sup> Dentre as possíveis razões para tal discrepância de resultados está a impossibilidade prática de avaliar todo o tecido tumoral na busca de “*hot spots*” (a área avaliada poderia teoricamente não representar o tumor em sua integralidade, podendo haver áreas mais ou menos vascularizadas que não foram incluídas nas lâminas da patologia definitiva). A própria seleção das áreas mais vascularizadas (“*hot spots*”) para a contagem de microvasos apresenta subjetividade inerente ao método disponível atualmente.

Com o intuito de tornar a aferição dos microvasos mais acurada e menos subjetiva, utilizamos a análise digital das imagens. O programa utilizado permitiu a captura e armazenamento das imagens, facilitou a contagem dos microvasos e impediu que eles fossem contados repetidamente. Mesmo empregando a análise digital das imagens e utilizando os programas de contagem de vasos, em nosso estudo não se encontrou associação entre DMV e parâmetros prognósticos tradicionais como estágio e grau. Da mesma forma, não se evidenciou associação entre DMV e sobrevida geral. Isso talvez signifique que a aferição da

DMV, na forma em que vem sendo realizada, não seja um parâmetro clinicamente importante em espécimes de ressecção transuretral de bexiga.

A busca de moléculas envolvidas no processo da angiogênese tumoral pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela regulação da formação de novos vasos no câncer de bexiga. O FT tem sido bastante pesquisado em outros tipos de câncer, porém a revisão da literatura mostrou carência de estudos relevantes na associação com neoplasia de bexiga, motivo pelo qual se optou pela realização desta pesquisa. A molécula do FT apresenta um espectro de funções que vai muito além da sua função primordial já reconhecida, conforme referido anteriormente, que é a de iniciar o processo da via extrínseca da coagulação, destacando-se, dentre elas, a relacionada à progressão tumoral e ao desenvolvimento de metástases. O fator tecidual desempenha papel na progressão tumoral por mecanismos relacionados à coagulação e também por uma via coagulação-independente, em que a porção citoplasmática do FT desencadeia sinalização intracelular. Há conseqüente estímulo angiogênico, devido à indução da produção de VEGF, e supressão da produção de trombospondina-1.

Em virtude dessa associação entre fator tecidual e angiogênese tumoral, assim como do seu papel na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases, estudos foram realizados avaliando a sua expressão em diversas neoplasias, assim como associação entre a intensidade de expressão do FT e pior prognóstico.<sup>90,91,92,93,94,95,107,109</sup>

Nosso estudo demonstra, pela primeira vez, a expressão imunoistoquímica do FT no carcinoma urotelial de bexiga em espécimes de ressecção endoscópica de tumor vesical. Na realidade, não há estudo algum publicado na literatura impressa, avaliando a associação entre o FT e o carcinoma urotelial de bexiga. Até o momento da redação deste texto, existe apenas um estudo publicado eletronicamente por Patry e colaboradores<sup>110</sup> em novembro de 2007, em que é avaliada a expressão imunoistoquímica do fator tecidual em espécimes de carcinoma

urotelial de bexiga músculo-invasivo, obtidos de cistectomia. Nesse trabalho, foi demonstrado que, no grupo de pacientes com linfonodos negativos, a maior expressão do FT foi estatisticamente relacionada à menor sobrevida câncer-específica. Adicionalmente, a análise multivariada realizada demonstrou risco 3,15 vezes maior de óbito por câncer. Portanto, a expressão do FT foi um fator prognóstico de sobrevida doença-específica nos pacientes com carcinoma urotelial de bexiga músculo-invasivo, com linfonodos negativos, tratados por cistectomia radical. Já o nosso trabalho, diferentemente do estudo acima referido, avaliou a intensidade de expressão do FT em espécimes de carcinoma urotelial de bexiga, obtidos por ressecção endoscópica de tumor vesical. Além disso, verificou a associação entre a expressão do FT e DMV nos tumores de bexiga, o que também ainda é inédito na literatura. No presente estudo, constatou-se que 76,1% dos espécimes expressaram de forma moderada ou intensa o FT, não sendo encontrada correlação estatística entre a intensidade de expressão do FT e os parâmetros prognósticos patológicos, estágio e grau. Verificamos, contudo, significância estatística entre a expressão do FT e o DMV, conforme demonstrado na tabela 11 e figura 5. Esses resultados são similares aos achados demonstrados em estudos em outros tumores. Carvalho<sup>114</sup>, estudando adenocarcinomas de próstata, observou associação entre DMV aumentada e alta expressão do FT. Para o autor, a correlação entre a expressão do FT e a angiogênese tumoral ficou fortalecida nas proximidades das regiões onde a atividade do FT era pronunciada, caracterizando uma relação causal entre a presença de FT nas células tumorais e o resultante incremento na produção de vasos sanguíneos pelas lesões. Da mesma forma, Poon e colaboradores<sup>115</sup> descreveram contagens microvasculares elevadas em carcinomas hepatocelulares em sítios de maior expressão do FT. Também Koomagi e colaboradores,<sup>92</sup> estudando neoplasias de pulmão não-avenocelulares, verificaram associação entre DMV e expressão de FT. A partir da linha de pesquisa da qual o presente estudo faz parte, em que foi avaliada a correlação entre DMV e expressão do FT em diferentes tumores,

utilizando a mesma metodologia quanto à técnica imunoistoquímica, contagem dos microvasos por meio de análise digital e análise da expressão do FT, os resultados foram os mais diversos. Fillmann,<sup>116</sup> estudando adenocarcinomas colo-retais, demonstrou haver correlação positiva entre expressão do FT e DMV. Contudo, Maciel<sup>117</sup>, avaliando tumores de Wilms, não encontrou associação positiva entre DMV e FT. Toneto,<sup>118</sup> avaliando adenocarcinomas gástricos, também não verificou associação entre a expressão do FT e a DMV, bem como Maahs,<sup>119</sup> estudando carcinomas epidermóides de cavidade oral. Novamente, as dificuldades metodológicas na aferição da DMV podem ter sido responsáveis por estes achados. No caso dos tumores de Wilms, por exemplo, a maior parte dos pacientes havia recebido quimioterapia neo-adjuvante, o que sabidamente compromete os resultados da análise da DMV. Nos casos dos adenocarcinomas gástricos e nos de tumores epidermóides da cavidade oral, a variabilidade na seleção dos “*hot spots*” pode ter tido implicações nos resultados.

Para avaliar a correlação entre intensidade de expressão do FT e sobrevida, reagrupamos os pacientes em dois grupos: 1. Baixa expressão de FT ( $\leq 25\%$ ) e 2. Moderada/alta expressão de FT ( $> 25\%$ ). Através do método de Kaplan-Meier, foi demonstrada significância estatística entre o grupo de baixa expressão de FT e o grupo de moderada/alta expressão. Nos outros estudos realizados em nossa linha de pesquisa, houve uma correlação positiva entre elevada expressão de FT e sobrevida em pacientes com tumores de Wilms.<sup>117</sup> No entanto, diferentemente dos nossos achados, não foi demonstrada correlação entre alta expressão de FT e sobrevida nos tumores colo-retais,<sup>116</sup> gástricos,<sup>118</sup> e de cavidade oral.<sup>119</sup> A razão para esta discrepância é incerta. Novamente poderíamos particularizar os achados: nos três últimos trabalhos citados, a maioria dos pacientes apresentava tumores avançados, com poucos pacientes em estágios iniciais de sua doença, o que poderia explicar parcialmente a falta de correlação da expressão do FT com sobrevida.

Apesar de o presente estudo apresentar algumas limitações pelo fato de ser retrospectivo, ter amostra pequena e ter perda de seguimento de aproximadamente 24% dos pacientes, seus achados são relevantes, uma vez que não há estudos correlacionando a expressão do FT em espécimes de ressecção endoscópica de carcinoma urotelial de bexiga. Da mesma forma, a correlação entre DMV e FT nos tumores de bexiga ainda não foi descrita na literatura. Adicionalmente, a associação entre a intensidade de expressão do FT e sobrevida nas neoplasias de bexiga foi relatada somente em um estudo.<sup>110</sup>

O presente estudo enquadra-se em uma das linhas de pesquisa da Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Clínica Cirúrgica, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que atualmente estuda angiogênese e marcadores tumorais em espécimes de neoplasias de cabeça e pescoço, próstata, cólon, bexiga e estômago. Especula-se que, confirmando sua importância na gênese desses tumores, o FT possa ser estudado como marcador sérico e/ou urinário nos pacientes com essas neoplasias. Mais adiante, a possibilidade de aplicações terapêuticas deve ser considerada e testada em modelos experimentais e clínicos bem delineados. O FT é atualmente reconhecido como o gatilho para o desenvolvimento do estado hipercoagulável em pacientes com câncer. Adicionalmente, como já referido no presente trabalho, exerce importante papel pró-angiogênico e no desenvolvimento de metástases. Portanto, a inibição específica da atividade do FT terá implicações na prevenção de eventos trombo-embólicos e também na supressão do crescimento e disseminação tumoral. Atualmente, há grande interesse nas ações do TFPI nos pacientes com câncer, uma vez que ele atua inibindo a atividade do FT na cascata de coagulação, reduzindo por consequência, o estado hipercoagulável tão comum em pacientes oncológicos. Além disso, o TFPI também bloqueia a atividade de sinalização celular desempenhada pelo FT, resultando, portanto, em um efeito antiangiogênico e antimetastático. No entanto, somente grandes concentrações de TFPI tem a capacidade de bloquear a ação

sinalizadora do FT. Também tem sido avaliado o efeito das heparinas e derivados para retardar a progressão tumoral e prolongar a sobrevivência dos pacientes com câncer, pois essas substâncias estimulam a produção de TFPI pelas células endoteliais.<sup>106</sup>

Com nosso estudo, esperamos colaborar para o lançamento de bases para o estudo do FT em neoplasias urológicas, o que poderá contribuir para avanços clínicos no diagnóstico, acompanhamento e tratamento dos tumores de bexiga, em um futuro já vislumbrado à luz das novas terapias moleculares em angiogênese tumoral.

## 7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo permitiu chegar às seguintes conclusões:

1-Houve expressão moderada ou alta do fator tecidual em 76,1% dos espécimes.

2-Não houve correlação entre a intensidade de expressão do fator tecidual e os fatores prognósticos estágio e grau. Entretanto, foi observada associação entre a intensidade da expressão do fator tecidual e densidade microvascular. Além disso, também foi demonstrada correlação entre a expressão do fator tecidual e sobrevida.

3-Não foi demonstrada associação entre densidade microvascular e os fatores prognósticos estágio e grau. Também não foi observada correlação entre densidade microvascular e sobrevida.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup> Messing EM. Urothelial tumors of the bladder. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell- Walsh Urology 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Sauders, 2007. p. 2407-46.
- <sup>2</sup> Nieder AM, Soloway MS. Eliminate the term “superficial” bladder câncer. J Urol 2006; 175:417-8.
- <sup>3</sup> Epstein JI, Amin, MB, Reuter VR, Mostofi FK: The World Health Organization/ International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol 1998; 22: 1435-48.
- <sup>4</sup> Jamal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thum MJ. Cancer statistics 2007. CA Cancer J Clin 2007; 57: 43-66.
- <sup>5</sup> Lynch CF, Cohen MB. Urinary System. Cancer 1995; 75: 316-29.
- <sup>6</sup> Fleshner NE, Her HW, Stewart AK, Murphy GP, Mettlin C, Menck HR. The National Cancer Data Base report on bladder carcinoma. Cancer 1996; 78: 1505-13.
- <sup>7</sup> Linn JF, Sesterhann I, Mostofi FK, Schoenberg M. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. J Urol 1998; 159: 1493-6.
- <sup>8</sup> Kishi K, Hirota T, Matsumoto K, Kakizoe T, Murase T, Fugita J. Carcinoma of the bladder: a clinical and pathological analysis of 87 autopsy. J Urol 1981; 125: 36-9.
- <sup>9</sup> Cao W, Cai L, Rao J, Pantuck A, Lu M, Dalbani G, Reuter V, Scher V et al. Tobacco smoking, GSTP1 polymorfism, and bladder carcinoma. Cancer 2005; 104: 2400-8.
- <sup>10</sup> Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP, Kadlubar FF. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder. Cancer Res 1995; 55: 5230-7.

- 
- <sup>11</sup> Vines P, Ronco G. Interindividual variation in carcinogen metabolism and bladder cancer risk. *Environ Health perspect* 1992; 98: 95-9.
- <sup>12</sup> Kaldor JM, Day NE, Kiltelmann B, Petersson F, Langmark F, Pedersen D, et al. Bladder tumors following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case control study. *Int J Cancer* 1995; 63: 1-6.
- <sup>13</sup> Cohen SM, Garland EM, St. John M, Okamura T, Smith RA. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 1992; 52: 3577-81.
- <sup>14</sup> Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol* 1985; 133: 1034-5.
- <sup>15</sup> Larsson SC, Orsino N, Brismar K, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* 2006; 49:2819-23.
- <sup>16</sup> Donat SM. Evaluation and follow-up strategies for superficial bladder cancer. *Urol Clin N Am* 2003; 30: 765-76.
- <sup>17</sup> Sobin DH, Wittekind CH, editors. *TNM classification of malignant tumors*. 6<sup>th</sup> ed. New York: Willey-Liss, 2002.
- <sup>18</sup> Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. *Histological typing of urinary bladder tumors*. Geneva: World Health Organization, 1973.
- <sup>19</sup> Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*, Chapter 2. Lyon: IARC Press 2004.
- <sup>20</sup> Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasm: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004; 46: 170-6.
- <sup>21</sup> Pavone-Macaluso M, Lopez-Beltran A, Aragona F, Pierfrancesco B, Fitzpatrick JM. The pathology of bladder cancer: an update on selected issues. *BJU Int* 2006; 98: 1161-5.
- <sup>22</sup> Slaton JW, Benedict WF, Dinney CP. P53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urol* 2001; 57: 852-859.

- 
- <sup>23</sup> Mitra AP, Datar R, Cote R. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insight into mechanisms, progression and target identification. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5552-64.
- <sup>24</sup> Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 1259-64.
- <sup>25</sup> Sarkis AS, Dalbani G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-9.
- <sup>26</sup> Lipponen PK. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1993; 53:365-70.
- <sup>27</sup> Fleshner N, Kapusta L, Elzer D, Herschorn S, Klotz L. p53 nuclear accumulation is not associated with decreased disease-free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of bladder. *J Urol* 2000; 164: 1177-82.
- <sup>28</sup> Lianes P, Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Fradet Y, Grossnan HB, Hemstreet GP, et al. Biomarker study of primary nonmetastatic versus metastatic invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1267-71.
- <sup>29</sup> Schmitz-Dräger BJ, Goebell PJ, Ebert T, Fradet Y. p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer: playground for urology scientists? *Eur Urol* 2000; 38: 691-9.
- <sup>30</sup> Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. Altered expression of retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1251-6.
- <sup>31</sup> Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, et al. Elevated and absent pRB expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* 1998; 58: 1090-4.
- <sup>32</sup> Xu HJ, Cairns P, Hu, SX, Knowles MA, Benedist WF. Loss of RB protein expression in bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer* 1993; 53: 781-4.

- 
- <sup>33</sup> Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1007-1013.
- <sup>34</sup> Messing EM. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 2530-7.
- <sup>35</sup> Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, Aeppli DM, Zhang G, Singleton TP, et al. Expression of epidermal growth factor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 166-76.
- <sup>36</sup> Mellon K, Wright C, Kelly P, Horne CH, Neal DE. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol* 1995; 153: 919-25.
- <sup>37</sup> Liukkonen T, Rajala P, Raitamen M, Rintala E, Lipponen P. Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (stage pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. *Eur Urol* 1999; 36: 393-400.
- <sup>38</sup> Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SC, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12.
- <sup>39</sup> Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua AS, et al. HER-2/*neu* amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4332-7.
- <sup>40</sup> Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1044-8.
- <sup>41</sup> Kruger S, Weitsch G, Buttner H, Matthiensen A, Bohmer T, Marquardt T, et al. Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Int J Oncol* 2002; 21: 981-7.
- <sup>42</sup> Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE, et al. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 1996; 155:321-6.

- 
- <sup>43</sup> Jimenez RE, Hussai M, Bianco FJ Jr, Vaishampayan U, Tabazcka P, Sakr W, Pontes JE, Wood DP, Grignon DJ. Her-2/*neu* overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2440-7.
- <sup>44</sup> Santos L, Amaro T, Costa C, Pereira S, Bento MJ, Lopes P, et al: Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer* 2003; 105: 297-72.
- <sup>45</sup> Popov Z, Hoznek, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefre-Belda MA, Bellot J, et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer* 1997; 80: 1472-81.
- <sup>46</sup> Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, et al. Prognostic significance of p53 , bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 3759-64.
- <sup>47</sup> Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP, Grossman B, Schalken JA, et al. Prognostic markers for bladder cancer: international consensus panel on bladder tumor markers. *Urol* 2005; 66: 64-74.
- <sup>48</sup> Streeter EH, Harris AL. Angiogenesis in bladder cancer- prognostic marker and target for future therapy. *Surg Oncol* 2002; 11:85-100.
- <sup>49</sup> Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Jung YD, Shaheen RM, Reinmuth N. Overview of angiogenesis: biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2001; 28: 94-104.
- <sup>50</sup> Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 515.
- <sup>51</sup> Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29: 15-8.
- <sup>52</sup> Boehm-Viswanathan T. Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy? *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 89-94.

- 
- <sup>53</sup> Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 18: 1182-6.
- <sup>54</sup> Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-63.
- <sup>55</sup> Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61: 253-70.
- <sup>56</sup> Crew JP, O'Brien T, Bradbulrn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 5281-5.
- <sup>57</sup> Suzuki K, Morita T, Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 2005; 12: 152-8.
- <sup>58</sup> Miyake H, Hara I, Yamanaka I, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer* 1999; 86: 316-24.
- <sup>59</sup> Zao Hua, Grossman HB, Hwang L, Troisi CL, Chamberlain RM, Chenoweth MA, et al. Increased plasma levels of angiogenin and the risk of bladder carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 30-5.
- <sup>60</sup> Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2474-84.
- <sup>61</sup> Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tunours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-79.
- <sup>62</sup> Bialas M, Okon K, Czopek J. Assessing microvessel density in gastric carcinoma: a comparison of three markers. *Pol J Pathol* 2003, 54: 249-52.

- 
- <sup>63</sup> Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.
- <sup>64</sup> Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340:145-6.
- <sup>65</sup> Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:401-9.
- <sup>66</sup> Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0,76mm) malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994; 145: 510-4.
- <sup>67</sup> Tarta C, Silva VD, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Chiele Neto C, Tanaka S. Digital image analysis and sterology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26: 201-6.
- <sup>68</sup> Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris Al. Quantification of angiogenesis as an indepent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994; 74: 762-6.
- <sup>69</sup> Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman F, Carrol P. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995; 154: 69-71.
- <sup>70</sup> Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 85:1603-12.
- <sup>71</sup> Philp EA, Stephenson TJ, Reed MW. Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Urol* 1996; 77: 352-7.
- <sup>72</sup> Inoue K, Slaton J, Karashima T, Yoshikawa C, Shuin T, Sweeney P, Millikan R, Diney C. The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4866-73.

- 
- <sup>73</sup> Goddard JC, Sutton CD, Furness PN, Kenneth JO, Kockelberg RC. Microvessel density at presentation predicts subsequent muscle invasion in superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2583-6.
- <sup>74</sup> Sagol O, Yorukoglu K, Sis B, Tuna B, Ozer E, Guray M, Mungan U, Kirkali Z. Does angiogenesis predict recurrence in superficial transitional cell carcinoma of bladder? *Urol* 2001; 57: 895-899.
- <sup>75</sup> Offersen BV, Knap MM, Marcussen N, Horsman MR, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Intense inflammation in bladder carcinoma is associated with angiogenesis and indicates good prognosis. *Br J Cancer* 2002; 87: 1422-30.
- <sup>76</sup> Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Sardi I, Rizzo M. Qualitative and quantitative analysis of angiogenesis factors in transitional cell bladder carcinoma: relationship with clinical course at 10 years follow-up. *Oncol Rep* 2005; 14: 251-5.
- <sup>77</sup> Prandoni P, Leasing AW, Buller HR. Deep vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 1992; 327:1128-33.
- <sup>78</sup> Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol* 2001, 106: 6-12.
- <sup>79</sup> Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343: 1846-50.
- <sup>80</sup> Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Forcier RJ, et al. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer* 1984; 53: 2046-52.
- <sup>81</sup> Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk GP, Rote WE, Green SJ, Pribluda VS. Tissue factor / factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 2003; 63: 2997-3000.
- <sup>82</sup> Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest* 2003; 124: 588-68.

- 
- <sup>83</sup> Carmeliet P, Collen D. Molecules in focus: tissue factor. *Int J Biochem & Cell Biol.* 1998; 30:661-7.
- <sup>84</sup> Higashi S, Iwanaga S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol* 1998; 67: 229-41.
- <sup>85</sup> Rickles FR, Hair GA, Zeff RA, Lee RA, Bona RD. Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells. *Thromb Haemost* 1995; 74: 291-5.
- <sup>86</sup> Semeraro N, Colocci M. Tissue factor in health and disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 759-64.
- <sup>87</sup> Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Van Vlaenderen P, Vlaenderen I et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383: 73-5.
- <sup>88</sup> Diehl JL, Borgel D. Sepsis and coagulation. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:454-60.
- <sup>89</sup> Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1997; 349: 769-71.
- <sup>90</sup> Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996; 56: 5063-70.
- <sup>91</sup> Kakar AK, Chinswangwatanakul V, Tebutt S, Lemoine NR, Williamson RC. A characterization of the coagulant and fibrinolytic profile of human pancreatic carcinoma cells. *Haemostasis* 1998; 28: 1-6.
- <sup>92</sup> Koomagi R, Volm M. Tissue factor expression in human non-small cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 1998; 79: 19-22.
- <sup>93</sup> Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996; 77: 1877-83.

- 
- <sup>94</sup> Abdulkadir AS, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000; 31: 443-7.
- <sup>95</sup> Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa a, Ishigami S, Arii S, et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000; 88: 295-301.
- <sup>96</sup> Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *EJSO* 2003; 29: 417-22.
- <sup>97</sup> Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Med* 1996; 2: 167-8.
- <sup>98</sup> Zhang J, Ding J, Zhang X, Shao X, Hào Z. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) production and angiogenesis by tissue factor (TF) in SGC-7901 gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 769-72.
- <sup>99</sup> Olliver V, Chabat J, Herbert JM, Hakim J, de Prost D. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1374-81.
- <sup>100</sup> Amirhosravi A, Meyer T, Amaya M, Davila M, Mousa SA, Robson BS, et al. The role of tissue factor inhibitor in tumor growth and metastasis. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 643-52.
- <sup>101</sup> Zacharski LR, Ornstein DL, Mamourian AC. Low-molecular-weight heparin and cancer. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 69-77.
- <sup>102</sup> Foster Y, Meye A, Albrecht S, Kotzsch M, Füssel S, Wirth MP, Schwenger B. Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. *Cancer Lett* 2003; 193: 65-73.
- <sup>103</sup> Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr DM, Stern PP. Tissue factor controls the balance of angiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 1320-7.

- 
- <sup>104</sup> Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol* 2001; 73: 145-50.
- <sup>105</sup> Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998; 101: 1372-8.
- <sup>106</sup> Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP et al. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998; 80: 598-602.
- <sup>107</sup> Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nature Med* 1996; 2: 209-15.
- <sup>108</sup> Nakasaki T, Wada, Shigemori C, Mioki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 69: 247-54.
- <sup>109</sup> Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2003; 62: 1078-82.
- <sup>110</sup> Patry G, Hovington H, Larue H, Harel F, Fradet Y, Lacombe L. Tissue factor expression correlates with disease-specific survival in patients with node-negative muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 2007 Nov [Epub ahead of print]
- <sup>111</sup> Adamson AS, Francis JL, Roath OS, Witherow ON, Snell ME. Urinary tissue factor levels in the transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1992; 148: 449-452.
- <sup>112</sup> Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M. Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 44-49.
- <sup>113</sup> Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1998; 96: 379-94.

- 
- <sup>114</sup> Carvalho GF. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual no câncer de próstata de humanos: correlação com angiogênese e aspectos clínicos-patológicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.
- <sup>115</sup> Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5339-45.
- <sup>116</sup> Fillmann LS. A expressão do fator tecidual no adenocarcinoma colo-retal: relação com angiogênese e aspectos clínicos-patológicos [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.
- <sup>117</sup> Maciel EO. Análise da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no tumor de Wilms e sua relação com angiogênese e aspectos clínicos-patológicos [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2007.
- <sup>118</sup> Toneto MG. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular no carcinoma gástrico: correlação com fatores prognósticos e sobrevida [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.
- <sup>119</sup> Maahs GS. Estudo do fator tecidual e da densidade microvascular como fatores preditivos de metástases ganglionares e de óbito nos carcinomas epidermóides da cavidade oral [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.