

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
FACULDADE DE MEDICINA

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DO FATOR  
TECIDUAL E DA DENSIDADE MICROVASCULAR NO CÂNCER  
GÁSTRICO:  
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS E SOBREVIDA**

**MARCELO GARCIA TONETO**

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

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Petry de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Porto Alegre

2006

Aos meus pais, José Édison e Neide, pelo exemplo de vida, e  
por terem proporcionado todas as condições para minha  
realização na vida pessoal e profissional.

Para minha esposa Sylvia, por sua compreensão,  
companheirismo e amor, fundamentais para a realização deste trabalho.

*“I would like to see the day when somebody would be appointed surgeon somewhere who had no hands, for the operative part is the least part of the work.”*

**Harvey Cushing (1869-1939)**  
Letter to Dr Henry Christian Nov 20, 1911

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Hamilton Petry de Souza, pela orientação e comprometimento com este trabalho, e pelo exemplo de Mestre durante toda a minha formação acadêmica e como cirurgião.

Ao professor Gustavo Franco Carvalhal, pela sua orientação, incentivo, sugestões e extrema dedicação em todas as suas atividades.

Ao professor Vinicius Duval da Silva, pelo auxílio na interpretação dos exames, críticas adequadas e apoio irrestrito para a realização deste estudo.

Ao meu pai José Edison Toneto e a meu irmão, José Édison Toneto Jr, por suas contribuições e críticas pertinentes na elaboração desta tese.

Aos colegas da Pós-Graduação em Cirurgia interessados nos estudos sobre angiogênese: Drs. Lúcio Fillmann, Eurico Dorneles, Elines Maciel, Gerson Maahs, e Luciano Eifler.

Ao Dr. Mário Wagner, pelas sugestões e auxílio na análise estatística.

Ao acadêmico Jorge G. Valle Filho, pela ajuda busca dos blocos de parafina e pelo auxílio no preenchimento e revisão do banco de dados.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Medicina, Sônia, Eloá e Mauricio, sempre zelosos no auxílio aos trâmites administrativos.

À Faculdade de Medicina da PUCRS pela excelência nas suas atividades assistenciais e de pesquisa, e pelo financiamento para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Medicina da PUCRS e ao Hospital São Lucas que, mais do que qualquer outro lugar, foram os meus lares nos últimos 20 anos.

Aos pacientes desta sofrida doença, os quais me ensinaram que, na vida de um médico, a compaixão e o conforto muitas vezes são tão ou mais importantes do que o conhecimento científico.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	
LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
SUMMARY	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1.Epidemiologia do câncer gástrico.....	2
2.2.Câncer gástrico: aspectos clínicos e anátomo-patológicos .....	4
2.3.Tratamento do adenocarcinoma gástrico.....	7
2.4.Angiogênese tumoral como fator de progressão neoplásica.....	10
2.5.Fenômenos trombo-embólicos e câncer: a importância do fator tecidual .	15
2.6.Relação entre fator tecidual e angiogênese.....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. Delineamento, população e amostra.....	24
4.2. Critérios de inclusão.....	25
4.3. Critérios de exclusão.....	25
4.4. Variáveis em estudo.....	25
4.5. Análise digital das imagens.....	29
4.6. Imunoistoquímica.....	29
4.7. Densidade microvascular.....	30
4.8. Expressão do fator tecidual .....	32
4.9. Análise estatística.....	34
4.10. Ética.....	35
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
5.1 Caracterização da amostra.....	36
5.2 Densidade microvascular.....	38

5.3 Expressão do fator tecidual.....	39
5.4 Relação entre expressão do fator tecidual e densidade microvascular. 41	
5.5 Análise da sobrevivência.....	42
5.6 Análise multivariada.....	46
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
<b>9.ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

CIOMS	<i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAB	Diaminoazobenzidina
DMV	Densidade microvascular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EP	Erro padrão
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FT	Fator tecidual
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
GB	<i>Gigabyte</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água Oxigenada
HR	<i>Hazard ratio</i> (Razão de azares)
HSL	Hospital São Lucas
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	<i>Kilodaltons</i>
MB	<i>Megabyte</i>
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
PBS	<i>Phosphate-Binding Saline</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
TGF	Fator de crescimento transformador
TIFF	<i>True Image File Format</i>
TVP	Trombose venosa profunda
UICC	União Internacional contra o Câncer
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Substâncias endógenas com efeitos angiogênicos.....	11
Quadro 2	Invasão do tumor na parede gástrica (Categoria T).....	26
Quadro 3	Invasão linfonodal (Categoria N).....	27
Quadro 4	Metástases a distância (Categoria M).....	27
Quadro 5	Estadiamento anátomo-patológico (pTNM).....	27
Tabela 1	Características clínicas e patológicas da população estudada.	37
Tabela 2	Estadiamento TNM da população estudada.....	38
Tabela 3	Relação entre as características clínico-patológicas e a densidade microvascular.....	39
Tabela 4	Expressão do fator tecidual em espécimes de adenocarcinoma gástrico.....	40
Tabela 5	Relação entre as características clínico-patológicas e a expressão do fator tecidual.....	41
Tabela 6	Análise multivariada correlacionando sobrevida com densidade microvascular e expressão do fator tecidual.....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formas de apresentação macroscópica dos tumores avançados.....	28
Figura 2	Coloração de microvasos (marrom) por anticorpos anti-CD 34 em secção tumoral (magnificação de 100X).....	31
Figura 3	Imagem obtida no programa após a inserção de grades de correção para contagem dos microvasos (magnificação de 400X).	32
Figura 4	Adenocarcinoma gástrico com menos de 25% das glândulas coradas. Categoria 1 (magnificação de 50X).....	33
Figura 5	Adenocarcinoma gástrico com praticamente todas as glândulas coradas. Categoria 4 (magnificação de 50X).....	34
Figura 6	Comparação entre a expressão do FT e a densidade microvascular.....	42
Figura 7	Curva de sobrevida geral dos pacientes.....	43
Figura 8	Curvas de sobrevida por estágio do câncer gástrico.....	44
Figura 9	Curvas de sobrevida para pacientes com alta ( $\geq 45$ vasos / campo) e baixa ( $< 45$ vasos / campo) densidade microvascular.....	45
Figura 10	Curvas de sobrevida para pacientes com alta e baixa intensidade de expressão imunoistoquímica do fator tecidual.....	46

## RESUMO

**TONETO, M.G. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular no câncer gástrico: correlação com fatores prognósticos e sobrevida.**

O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína que desempenha papel de iniciador da via extrínseca da cascata da coagulação e modulador do processo de angiogênese. Sua relação com o desenvolvimento de tumores e de metástases tem sido descrita em várias neoplasias malignas. Foi realizado estudo de marcação imunoistoquímica para verificar a expressão do FT em 50 espécimes de adenocarcinomas gástricos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa e sua correlação com a densidade microvascular (DMV), avaliada com o uso do anticorpo anti-CD34 como marcador endotelial. A intensidade da sua expressão foi comparada com dados clínicos e patológicos, estadiamento TNM, fatores prognósticos e sobrevida. Em todos os pacientes (100%) houve expressão imunoistoquímica do FT nas células neoplásicas avaliadas através de anticorpo monoclonal específico para esta proteína. A DMV média foi de 48,72 ( $\pm 19,06$ ) microvasos por campo. Não houve relação estatisticamente significativa entre a intensidade da expressão do FT e a densidade microvascular. Não foi observada relação entre a expressão do FT e fatores usuais de mau prognóstico no adenocarcinoma gástrico. Apesar dos pacientes com alta intensidade de expressão do FT apresentarem curvas de sobrevida melhores e estatisticamente significativas na análise univariada ( $P=0,003$ ), na análise de regressão multivariada não foi observada diferença na sobrevida entre os grupos. Em conclusão, apesar de expresso em todos os espécimes tumorais, o fator tecidual não mostrou relação com a angiogênese e o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma gástrico neste estudo.

## SUMMARY

TONETO, M.G. **Immunohistochemical analysis of tissue factor expression and microvessel density in gastric carcinoma: correlations with prognosis and survival.**

Tissue factor (TF) is protein recognized as a primary initiator of the extrinsic pathway of blood coagulation and a modulator associated with increased angiogenesis. Recent studies have shown that TF is associated with cancer and with the development of metastasis in various malignancies. This study was designed to evaluate the correlation of TF expression and microvessel density (MVD) with clinical presentation, TNM and prognosis in human gastric carcinoma. Tissue samples were obtained from 50 specimens of gastric carcinomas from patients submitted to operations with curative intent. Clinicopathologic and follow-up data of the patients were prospectively collected. Immunohistochemical expression of tissue factor was examined and correlated to tumor microvessel density, evaluated using anti-CD34 as the endothelial marker, clinicopathologic data, TNM staging and overall survival. Expression of TF was found in tumoral cells from all patients (100%) studied. The mean MVD was 48,72 ( $\pm$ 19,06) per field. No significant positive correlation was found between TF and MVD. In addition, no significant positive correlation was found between TF and clinicopathologic findings and TNM staging. In univariate analysis, patients with high TF expression had better overall survival ( $P=0,003$ ) but, in multivariate analysis no differences were shown. In conclusion, tissue factor expression was found in all specimens, but did not correlate with either angiogenesis or prognosis of gastric carcinoma in this study.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de estômago é o tumor mais freqüente do trato gastrointestinal. Quando avaliada a sua incidência em bases mundiais, ocupa o quarto lugar, sendo o segundo tipo de neoplasia maligna que mais mata no mundo. Apesar do declínio evidente de sua incidência em países desenvolvidos na Europa, assim como nos Estados Unidos, o câncer gástrico é ainda hoje um dos tumores mais freqüentes no Japão e em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África e América Latina. A melhor conduta para seu tratamento tem sido intensamente discutida nos últimos anos, porém ainda depende fundamentalmente de uma ressecção cirúrgica agressiva, procedimento que não é isento de riscos e complicações. Apesar de gerar controvérsia, o emprego do tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia vem crescendo em importância nos estudos mais recentes. Com exceção do Japão, onde a neoplasia é diagnosticada em fases iniciais, os resultados em termos de cura ainda são desalentadores. A busca de melhores alternativas terapêuticas, de novos marcadores biológicos e o entendimento dos mecanismos moleculares para a compreensão dos fenômenos envolvidos na gênese e desenvolvimento dessa neoplasia são estímulo para estudos sobre a biologia molecular desses tumores.

No presente trabalho, será revisada a literatura sobre conceitos fundamentais relativos ao câncer gástrico. Adicionalmente, serão discutidos fatores relacionados à neoformação de vasos sangüíneos que acompanha o desenvolvimento neoplásico, fenômeno conhecido como angiogênese, fornecendo noções básicas sobre o fator tecidual e sua importância no contexto da biologia tumoral.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Epidemiologia do Câncer Gástrico

Embora em nível global o câncer de estômago seja um dos mais prevalentes na população geral, durante o século passado houve redução de cerca de quatro vezes em sua taxa de mortalidade. Esse fenômeno deve-se principalmente à marcada diminuição em sua incidência e aos avanços dos métodos de investigação complementar, os quais permitem que o diagnóstico e o tratamento sejam realizados de maneira mais precoce. Mesmo com esse decréscimo, o adenocarcinoma gástrico ainda é a segunda causa de morte por doença maligna no mundo, suplantada apenas pelo câncer de pulmão.<sup>1</sup>

Apesar da diminuição de sua incidência nos países desenvolvidos do Hemisfério Norte, o câncer gástrico ainda é a neoplasia maligna mais freqüente no Japão, com taxas de incidência que se aproximam de 100 casos para cada 100.000 habitantes e um dos mais freqüentes em países em desenvolvimento.<sup>2</sup> É o quarto tumor mais freqüente na França<sup>3</sup> e, nos Estados Unidos, é o décimo quarto em incidência e o décimo terceiro em mortalidade.<sup>4</sup>

Estimativas para o ano de 2006 indicam que o câncer de estômago será o quinto tumor em incidência e o segundo lugar em mortalidade no Brasil, quando avaliados os dois sexos em conjunto.<sup>5</sup> Dados publicados pelo Ministério da Saúde em 1998, indicam que o câncer gástrico foi o terceiro tumor que mais matou no Brasil entre os homens, superado pelo câncer de pulmão e de próstata e o quinto entre as mulheres, suplantado pelo câncer de mama, de pulmão, colorretal e do colo de útero.<sup>6</sup> Sua incidência difere conforme as regiões geográficas

do país, variando desde 51,6/100.000 habitantes na região Norte até 29/100.000 habitantes na região Sul.<sup>7</sup> No estado do Rio Grande do Sul, entre os homens, é o quarto tumor em mortalidade, abaixo dos tumores de pulmão, de próstata e de esôfago e o quinto entre as mulheres, seguindo mama, pulmão, colo do útero e intestino grosso.<sup>8</sup> A neoplasia maligna do estômago causou 10% das mortes por câncer no Brasil no ano de 1989. No ano de 2005, as estimativas foram de 1840 casos novos no estado do Rio Grande do Sul e de 240 na cidade de Porto Alegre.<sup>5</sup>

Existe marcada variação em sua incidência conforme os diversos países e, mesmo em uma região, podem existir taxas diferentes na população devido a vários fatores, tais como raça, classe econômica e exposição a agentes ambientais.<sup>9</sup> O tumor gástrico está relacionado com o nível socioeconômico, apresentando maior incidência em populações de baixa renda. O adenocarcinoma gástrico não é freqüente em pessoas com idade abaixo de 40 anos,<sup>10</sup> sendo a prevalência e a mortalidade desse tumor significativamente maiores entre indivíduos do sexo masculino com mais de 60 anos de idade.<sup>11</sup> A proporção geral do câncer gástrico é de dois homens para cada mulher, sendo uma doença característica de pessoas idosas.<sup>12</sup>

A etiologia do câncer gástrico é complexa, sendo que vários fatores exógenos e endógenos estão envolvidos no seu aparecimento.<sup>13</sup> Existem indícios de que a maior parte dos tumores estejam relacionados ao ambiente externo, ocorrendo de forma esporádica, e não associados à herança genética.<sup>14</sup> Fatores dietéticos estão entre os principais fatores de risco associados ao seu desenvolvimento. Diversas hipóteses têm sido investigadas, sendo que uma das mais aceitas é a da formação de compostos nitrosos devido à ingestão de nitritos na alimentação. Dietas baseadas em alimentos conservados em sal ou defumados também aumentariam a predisposição para o surgimento de tumores gástricos.<sup>15</sup> Frutas e vegetais frescos seriam fatores protetores para o desenvolvimento do câncer de estômago.<sup>16</sup> A influência do álcool na carcinogênese gástrica ainda não está definitivamente comprovada,

apesar de que usuários de bebidas alcoólicas apresentem tendência aumentada para desenvolver essa neoplasia.<sup>17</sup> Indivíduos tabagistas têm risco duas a três vezes maior de desenvolver o adenocarcinoma gástrico do que não-fumantes.<sup>18</sup>

A gastrite atrófica crônica e a metaplasia intestinal são consideradas lesões predisponentes para o câncer gástrico, pois podem progredir para displasia e subseqüentemente para carcinoma. A prevalência dessas lesões é alta em locais onde o adenocarcinoma gástrico é mais freqüente.<sup>19</sup> Alguns estudos demonstram que pacientes submetidos à gastrectomia apresentam risco maior de desenvolver câncer no estômago, independente do tipo de reconstrução do trânsito digestivo, principalmente após quinze anos da cirurgia inicial.<sup>20</sup> O *Helicobacter pylori* cria condições favoráveis para o surgimento do câncer pela indução de inflamação crônica, atrofia e metaplasia e, a partir da década passada, vem sendo fortemente associado ao desenvolvimento da neoplasia gástrica.<sup>21</sup> Radiações, história familiar, anemia perniciosa, tipo sanguíneo A e doenças ocupacionais<sup>22</sup> também estão relacionados ao surgimento do adenocarcinoma gástrico, entretanto são de pouca importância na prevenção primária da doença. A ocorrência de câncer gástrico familiar é incomum, sendo que mais de 90% dos pacientes afetados não relatam história familiar da neoplasia.<sup>23</sup>

Acredita-se que a patogênese do câncer gástrico é multifatorial, com vários componentes exercendo maior ou menor influência em populações diferentes.<sup>24</sup>

## 2.2. Câncer Gástrico: aspectos clínicos e anátomo-patológicos

Mais de 90% dos tumores que ocorrem no estômago são malignos, sendo o tipo histológico mais freqüente de neoplasia maligna o adenocarcinoma que ocorre em mais de 90% dos casos.<sup>25</sup>

O adenocarcinoma gástrico freqüentemente não apresenta sintomas enquanto é superficial e potencialmente curável. Desconforto gástrico, dor vaga, anemia, perda de peso e



falta de apetite são os sintomas principais e, quando ocorrem, são indícios de doença avançada.<sup>26</sup> O exame físico geralmente não revela sinais da doença a não ser nos tumores avançados, os quais podem se apresentar com massa palpável, caquexia e ascite. A endoscopia digestiva alta é o método de escolha para o diagnóstico do adenocarcinoma gástrico, pois permite a visualização direta do tumor, a mensuração de sua extensão e a remoção de tecidos para análise histológica.<sup>27</sup>

A taxa de sobrevivência geral em cinco anos é de cerca de 10%.<sup>4</sup> Nos casos de doença inicial, que podem ser submetidos à ressecção potencialmente curativa, essa perspectiva aumenta para 25-40%.<sup>28</sup> Esse aumento representa importante melhora no prognóstico e justifica o incentivo ao diagnóstico precoce nos países com alta incidência da doença.<sup>29</sup> Apesar de todos os avanços, no mundo ocidental o diagnóstico continua a ser realizado em fases tardias na evolução do tumor.<sup>30</sup> Com exceção do Japão, onde a alta incidência mobiliza setores de saúde pública com investimento na busca de lesões na fase precoce, através de exames de rotina inclusive em indivíduos assintomáticos, o diagnóstico normalmente é realizado nos estágios mais avançados da doença. Com a busca intensa de fases mais iniciais do tumor, estudos japoneses recentes demonstram que o número de pacientes com tumores precoces já superam os de câncer avançado.<sup>29</sup> Essa não é a realidade nos países ocidentais, onde o diagnóstico normalmente é realizado em fases mais avançadas da neoplasia, quando a possibilidade de cura ou mesmo de um tratamento adequado é reduzida.<sup>30</sup> Estudos de rastreamento em países de baixa incidência são questionados quanto a sua validade, devido à menor probabilidade de detecção da doença e ao baixo custo-benefício da avaliação de toda a população.<sup>31</sup>

A localização mais freqüente do adenocarcinoma no estômago é o antro,<sup>32</sup> porém estudos recentes têm demonstrado uma tendência à localização mais proximal no órgão, com o envolvimento da região do fundo e da cárdia, principalmente em países desenvolvidos da Europa.<sup>33</sup>

O câncer de estômago pode se disseminar através da parede do órgão, inclusive com invasão direta de órgãos vizinhos (baço, pâncreas, diafragma, cólon e fígado), para linfonodos regionais e, a distância, através do peritônio (ovário, fundo de saco de Douglas) e por via hematogênica com metástases para outros órgãos (fígado, pulmão, ossos, medula óssea,

cérebro).<sup>34</sup> O sistema mais utilizado para se realizar o estadiamento do câncer gástrico é o TNM, proposto pela UICC (União Internacional Contra o Câncer),<sup>35</sup> o qual se apóia em três componentes: T- a extensão do tumor primário na parede gástrica, N- ausência ou presença e extensão das metástases em linfonodos regionais e M- ausência ou presença de metástases a distância. A classificação histopatológica (pós-cirúrgica) é designada pTNM. O estadiamento clínico pré-operatório é fundamental para a seleção do método terapêutico a ser empregado, enquanto o estadiamento histopatológico pós-operatório fornece dados mais precisos para estimar o prognóstico e avaliar os resultados finais do tratamento.

A invasão do tumor na parede gástrica é o fator mais importante no prognóstico dos pacientes com essa enfermidade. Quando o tumor está restrito à mucosa e submucosa, é definido como precoce, possibilitando sobrevida acima de 90% em cinco anos.<sup>36</sup> Tumores restritos à camada mucosa podem ser avaliados com a possibilidade da lesão ser removida endoscopicamente com taxas de cura próximas a 100%.<sup>37</sup> Para a realização dessa ressecção, é obrigatório o emprego da ultra-sonografia endoscópica, que é o melhor método para avaliação da profundidade do tumor na parede gástrica.<sup>38</sup>

Além da invasão do tumor na parede do estômago, do comprometimento linfonodal e das metástases à distância, o grau de diferenciação e a topografia da lesão são fatores importantes na avaliação dos portadores da doença.<sup>39</sup> A tomografia computadorizada é o exame complementar mais utilizado para o estadiamento dos pacientes com adenocarcinoma gástrico,<sup>40</sup> podendo detectar metástases hepáticas, linfadenomegalias, presença de ascite e invasão direta de outros órgãos. Karpeh<sup>41</sup> indica o uso da videolaparoscopia como método importante na avaliação pré-operatória pelo benefício de contra-indicar a laparotomia nos pacientes com carcinomatose peritoneal, cujo diagnóstico pelos métodos convencionais de imagem tem alto índice de falha. Além da importância no prognóstico, o estágio influencia na

morbidade, pois lesões mais avançadas tendem a ser tratadas com procedimentos de maior porte, e, portanto, mais sujeitos a complicações.

Outros fatores prognósticos que devem ser avaliados pelo patologista ao analisar um câncer gástrico são o grau de diferenciação tumoral, o tamanho do tumor, a localização e a apresentação macroscópica.

Novos fatores como índices proliferativos, expressão de oncogenes e de genes supressores tumorais entre outros, estão sendo estudados e, provavelmente, ajudarão a definir melhor o prognóstico dos pacientes com câncer gástrico no futuro.<sup>42</sup> Os conhecimentos baseados no estudo da biologia molecular já estão influenciando estratégias clínicas de tratamento dos pacientes com predisposição genética para essa doença, sendo que, em 2001, foi relatado o primeiro estudo no qual foi indicada gastrectomia total profilática em seis pacientes com mutações no gene da caderina-E.<sup>43</sup> Nessa série, apesar de os pacientes não evidenciarem tumor na avaliação endoscópica, todos já mostravam neoplasia no exame patológico das peças.

### 2.3. Tratamento do Adenocarcinoma Gástrico

O primeiro relato de câncer gástrico de que se tem conhecimento foi descrito por Avicenna ao final do primeiro milênio e, somente quase mil anos após, um cirurgião austríaco, Billroth, em janeiro de 1881, realizou uma ressecção bem sucedida do antro gástrico por tumor maligno de estômago.<sup>44</sup> Até meados do século passado, os aspectos oncológicos da cirurgia do câncer gástrico não eram valorizados, sendo o tratamento semelhante ao empregado para a úlcera péptica. Assim como a paciente operada por Billroth apresentou recidiva da doença e morreu três meses depois da cirurgia, os cirurgiões da época defrontavam-se com o dilema de uma melhora no desenvolvimento técnico do procedimento,

porém com pobres resultados de sobrevida a longo prazo. A partir de então, foram adotadas técnicas de ressecção gástrica mais radicais para controle da doença, porém com aumento no índice de complicações e taxas de mortalidade.

Os avanços nos cuidados pré e pós-operatórios, o desenvolvimento dos antibióticos e o suporte das unidades de tratamento intensivo que ocorreram durante as últimas décadas fizeram a mortalidade pós-operatória diminuir de índices superiores a 50% para níveis abaixo de 1% no Japão.<sup>45</sup>

O tratamento curativo ideal para o câncer gástrico é a ressecção cirúrgica completa, com margens de segurança adequadas, em conjunto com o grande epíplon e os linfonodos regionais.<sup>46</sup> O estômago está em íntimo contato com o pâncreas, cólon transverso, mesocólon, baço, fígado, diafragma e bolsa omental. O tumor pode invadir qualquer uma dessas estruturas por contigüidade e pode ser necessária a remoção cirúrgica em bloco desses órgãos, para se obter uma ressecção completa da neoplasia.

A ressecção gástrica é o melhor tratamento, mesmo em pacientes com doença avançada ou quando existem evidências de que não pode ser realizada a retirada total do tumor, sendo, então, considerada uma gastrectomia paliativa. Na evidência de ascite com presença de células malignas, invasão de estruturas nobres, carcinomatose peritoneal ou doença metastática extensa, o tumor deve ser considerado irressecável, e os pacientes devem somente ser submetidos a procedimentos paliativos para melhora dos sintomas, principalmente em casos de obstrução ou sangramento.<sup>47</sup> Deve ser evitada a laparotomia para diagnóstico de condições de irressecabilidade, pois está associada a alto índice de complicações.<sup>34</sup>

A principal complicação do tratamento cirúrgico é a deiscência de sutura nas anastomoses necessárias para a reconstrução do trato gastrointestinal. A incidência de complicações para as cirurgias gástricas varia de menos de 10% a mais de 50% dos casos.<sup>48</sup> A

mortalidade operatória dos pacientes submetidos à cirurgia de ressecção do tumor está associada a diversos fatores tais como idade, estágio da doença, doenças associadas e tipo de procedimento empregado.<sup>11</sup>

No mundo ocidental, o diagnóstico do adenocarcinoma gástrico geralmente é realizado nas fases mais avançadas da doença, o que impossibilita a ressecção completa do tumor e das cadeias linfonodais em grande número de pacientes. Estudos foram realizados para avaliar o uso do tratamento neo-adjuvante para tentar a diminuição do tumor e a eliminação de micrometástases.<sup>49</sup> Infelizmente, dados de trabalhos prospectivos randomizados não apóiam esta conduta,<sup>50</sup> a qual deve ser restrita somente a grupos bem controlados em caráter experimental. Até o ano de 2001, o uso de tratamento adjuvante à cirurgia de ressecção do câncer gástrico não era consensual.<sup>51</sup> A partir dessa data, com a publicação dos resultados de um estudo prospectivo randomizado multicêntrico nos Estados Unidos, pelo grupo de Macdonald,<sup>52</sup> a conduta de quimioterapia e radioterapia adjuvantes começou a ser adotada em larga escala no tratamento do adenocarcinoma gástrico, apesar das críticas à qualidade da ressecção linfonodal neste estudo.<sup>53</sup>

A ressecção cirúrgica permanece sendo a única opção terapêutica com possibilidade de cura para os portadores dessa doença. No entanto, existem temas discutíveis no manejo de tais pacientes, como a extensão da ressecção gástrica, a extensão da ressecção linfonodal<sup>54,55</sup> e a utilização de tratamento adjuvante. A melhora na sobrevida dos indivíduos com câncer gástrico somente será alcançada com o desenvolvimento de novas formas efetivas de tratamento sistêmico.

#### **2.4. Angiogênese Tumoral como Fator de Progressão Neoplásica**

Um sistema circulatório eficiente é mandatório para todas as atividades em organismos pluricelulares, visando assegurar oferta de oxigênio e de nutrientes para auxiliar o processo de excreção de substâncias tóxicas. Durante o desenvolvimento embrionário, os vasos são formados a partir de tecido mesenquimal em processo chamado de vasculogênese. O processo de formação de novos ramos vasculares, a partir desses vasos já formados, é chamado de angiogênese. Tal processo é verificado fisiologicamente no desenvolvimento fetal, na hiperplasia endometrial durante o ciclo menstrual e na cicatrização de feridas.<sup>56</sup> Além dessas situações, a angiogênese está envolvida em uma série de condições patológicas nas quais os processos de inflamação e de isquemia estão presentes.<sup>57</sup> O conceito de que o crescimento tumoral e o processo de formação de metástases sejam dependentes do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi consolidado por Folkman,<sup>58</sup> no início da década de 70. Inúmeros estudos a partir dessa data têm confirmado as hipóteses de Folkman e demonstrado a importância do processo de angiogênese no desenvolvimento dos tumores.

O surgimento de novos vasos em um tumor envolve múltiplos passos. Nas primeiras etapas do desenvolvimento tumoral, que são as primeiras divisões celulares patológicas, não há o envolvimento dos vasos neoformados. Essas divisões permitem ao tumor atingir um volume aproximado de 2-3 mm.<sup>58</sup> A partir do desenvolvimento tecidual além deste tamanho, apenas o processo de difusão de oxigênio não permite o desenvolvimento tecidual e tem início um processo de hipóxia. A hipóxia tecidual pode induzir fatores de crescimento e desequilibrar o processo normal de ajuste entre fatores pró e antiangiogênicos, que se ligam a receptores específicos de células endoteliais, as quais proliferam, migram e transformam-se em novos vasos capilares. Existem vários indutores e inibidores endógenos da angiogênese identificados,<sup>59</sup> sendo que os principais estão listados no quadro 1. O mais potente e específico fator angiogênico conhecido é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é secretado por quase todos os tumores sólidos.<sup>60</sup> Dentre os fatores que inibem a

angiogênese, o mais importante parece ser a trombospondina-1.<sup>59</sup> A comprovação da existência de agentes antiangiogênicos, que promovem a inibição do crescimento tumoral, revela a importância da identificação dessas substâncias e as novas possibilidades criadas para o tratamento do câncer.<sup>61</sup>

**Quadro 1. Substâncias endógenas com efeitos angiogênicos.**

<u>Fatores pró-angiogênicos</u>	<u>Fatores antiangiogênicos</u>
Fatores de crescimento de fibroblastos	Interferon $\alpha$ e $\beta$
Fator de crescimento do endotélio vascular	Interleucina-12
TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$	Trombospondina-1
Prostaglandinas E-1 e E-2	Fatores derivados de cartilagem
Interleucina-8	Endostatina
Ciclooxigenase-2	Angiostatina
Fator Tecidual	Vasostatina

O estudo e o reconhecimento da angiogênese como fenômeno importante no processo do desenvolvimento tumoral tomou grande impulso no final da década de 90, principalmente com os estudos relacionados aos tumores de mama<sup>62</sup> e aos sarcomas.<sup>63</sup>

O uso de técnicas imunoistoquímicas permite verificar e quantificar a presença da microcirculação tumoral, a qual não é vista através de técnicas usuais de microscopia. A identificação da angiogênese em tumores pode ser realizada através de diversos métodos, sendo a identificação da densidade microvascular (DMV) um dos mais utilizados. A DMV reflete a intensidade da angiogênese tumoral e vários estudos demonstram a sua correlação com a expressão da angiogênese, com o crescimento tumoral e com a ocorrência de metástases a distância.<sup>64</sup> Diversos anticorpos podem ser usados para identificação da

microvascularização, sendo os mais estudados o anti-CD34, anti-CD31, anti-FVIII e anti-CD105.<sup>65</sup> Os vasos corados pelo método são contados em microscopia de grande aumento nas áreas de maior concentração vascular, os chamados “*hot-spots*”. Através dessa metodologia, Weidner e colaboradores,<sup>66</sup> estudando 49 pacientes com carcinoma de mama invasor, demonstraram que a contagem de microvasos foi significativamente maior no grupo de pacientes que desenvolveram doença metastática, sugerindo que a densidade microvascular poderia ser um fator preditivo independente para desenvolvimento de metástases a partir de neoplasias malignas de mama. A partir desse relato, a angiogênese tem sido quantificada através da determinação da densidade microvascular. Além do carcinoma de mama, a vascularização tumoral correlaciona-se diretamente ao prognóstico de outros tumores como o carcinoma de pulmão,<sup>67</sup> de próstata<sup>68</sup> e ao melanoma.<sup>69</sup>

A partir dos estudos de Shing e colaboradores,<sup>70</sup> em amostras de condrossarcoma, iniciaram-se os estudos com inibidores da angiogênese como alvo para bloqueio tumoral. Dvorak e colaboradores<sup>71</sup> aprimoraram os estudos de um novo agente associado à permeabilidade vascular e angiogênese, denominado como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é provavelmente a substância endógena com o mais potente efeito pró-angiogênico conhecido. Sua presença aumenta a permeabilidade vascular e constitui importante estímulo para desenvolvimento de células endoteliais.

Pesquisas sobre os fatores responsáveis pela angiogênese comportam, além da importância na avaliação prognóstica, um futuro promissor como alvos potenciais para o tratamento do câncer. Arap e colaboradores<sup>72</sup> descreveram as principais vantagens teóricas da terapêutica antiangiogênica em relação ao tratamento quimioterápico convencional: a) as células da microvascularização endotelial são geneticamente estáveis, com taxas de mutação muito baixas; b) a terapia antiangiogênica atacaria alvos muito específicos da vascularização tumoral, com muito baixa toxicidade sistêmica; c) a rede de capilares neoformados está



exposta diretamente às substâncias carregadas pela corrente sanguínea; d) a combinação de drogas antiangiogênicas com drogas quimioterápicas convencionais ou radioterapia poderia teoricamente ter efeito multiplicador no combate ao tumor.

Existem controvérsias sobre a metodologia de interpretação para avaliar a DMV. A contagem manual dos “*hot spots*” pode ser fonte de vícios devido a seu caráter subjetivo e a variações entre observadores. Também o uso de diferentes anticorpos pode ser causa de confusão entre os diversos autores. O uso da imagética, com captura digital das imagens e sua leitura no computador, pode reduzir o caráter subjetivo de avaliação.<sup>73</sup>

Existem estudos que relacionam a densidade microvascular (DMV) com inúmeros tumores de diversos sistemas. Uma revisão neste sentido mostra que o significado clínico desse parâmetro de quantificação da angiogênese tumoral apresenta ampla variação quanto a sua importância prognóstica. A maior parte dos estudos mostra que o grau de neovascularização em diversos tumores do tubo digestivo é fator prognóstico importante. Alguns resultados negativos, entretanto, colocam dúvidas a este respeito.

A partir do ano de 1995 começaram a surgir na literatura, principalmente japonesa, os primeiros estudos demonstrando a influência prognóstica da densidade de microvasos em adenocarcinomas gástricos. Maeda e colaboradores,<sup>74</sup> em análise de 129 espécimes de câncer gástrico, demonstraram que a expressão do VEGF apresentava relação direta com a DMV, com a presença de linfonodos comprometidos, com metástases hepáticas e com pior prognóstico. Erenoglu e colaboradores,<sup>75</sup> em estudo de 57 casos, descreveram que a angiogênese é um fator independente de risco para recorrência e pode ser utilizada na decisão sobre o uso de tratamentos adjuvantes. Du e colaboradores,<sup>76</sup> em estudo com 59 casos de câncer de esôfago e 80 casos de câncer gástrico, observaram expressão do VEGF em 81,3% das amostras esofágicas e 67,5% das gástricas. A contagem microvascular foi maior nas lesões com envolvimento linfonodal, mais indiferenciadas e associadas a estágios mais

avanzados da doença. Ichinoe e colaboradores,<sup>77</sup> comparando tumores gástricos precoces do tipo superficial com os do tipo invasivo, demonstraram a relação entre a expressão do VEGF, da ciclo-oxigenase-2 e da DMV nas lesões mais infiltrativas, de pior prognóstico. Os tumores superficiais apresentaram características de baixas taxas neovascularização.

Contrariamente a tais resultados, Tanigawa e colaboradores,<sup>78</sup> em estudo com 163 pacientes, mostraram que tumores que expressavam mais intensamente o VEGF apresentavam sobrevida e prognóstico melhor. Ikeguchi e colaboradores,<sup>79</sup> em estudo de 97 pacientes com invasão de serosa porém sem linfonodos comprometidos (T3, N0, estágio 2), demonstraram que os índices de proliferação tumoral, a DMV e o prognóstico não tinham relação com a expressão do VEGF. Da mesma forma, Kido e colaboradores<sup>80</sup> não encontraram relação prognóstica nos pacientes que apresentavam alta expressão de interleucina-8, fator pró-angiogênico conhecido no adenocarcinoma gástrico, e à expressão do VEGF.

Com o avanço das técnicas para detecção de fatores angiogênicos no plasma, Yoshikawa e colegas<sup>81</sup> avaliaram o significado prognóstico do VEGF e do fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) séricos em pacientes submetidos à ressecção por adenocarcinoma gástrico. Os autores relataram que a presença de VEGF no plasma tem relação com maior índice de recidivas, incluindo metástases hepáticas. A avaliação do bFGF, entretanto, não mostrou relevância na mesma análise. Saito e colaboradores<sup>82</sup> estudaram o fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta$  1), o qual na análise univariada mostrou relação com pior prognóstico, porém, quando avaliado na análise multivariada, não mostrou importância prognóstica.

Os estudos e a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação de vasos nos tumores de estômago são importantes devido à possibilidade teórica do uso de agentes antiangiogênicos para bloquear a formação de vasos e, conseqüentemente, estabilizar o crescimento do tumor, diminuindo sua capacidade de progressão. Além disso, o

desenvolvimento de resistência às drogas não parece ser comum.<sup>83</sup> A terapia antiangiogênica é uma das alternativas mais promissoras para o tratamento do câncer gástrico. Estudos em animais em laboratório têm se mostrado positivos, porém a complexidade e as características peculiares do tratamento de seres humanos serão um desafio para cirurgiões e oncologistas envolvidos no tratamento do câncer de estômago.

Frente a esses achados conflitantes na literatura, a busca de outros fatores associados à angiogênese tumoral, além da contagem dos vasos, parece fundamental para que se possa compreender melhor a biologia das lesões e, assim, expandir o arsenal terapêutico.

### **2.5. Fenômenos Trombo-Embólicos e Câncer: a importância do Fator Tecidual**

Os estudos sobre a associação entre a ocorrência de fenômenos trombo-embólicos e câncer remontam ao trabalho de Trousseau, que, em 1865, identificou pela primeira vez a associação entre trombose venosa idiopática e neoplasias, descrevendo a síndrome que leva seu nome. Curiosamente, Trousseau morreu após desenvolver trombose venosa profunda seis meses após ter sido diagnosticado com câncer gástrico.<sup>84</sup>

A gênese dos fenômenos trombo-embólicos em paciente com câncer é complexa e está relacionada a propriedades pró-coagulantes do tumor, a células endoteliais da própria neoplasia e a processos inflamatórios.<sup>85</sup> Contribuem também a estase venosa, os defeitos vasculares e a diminuição de fatores inibidores ao processo de fibrinólise que são mecanismos normais de defesa, os quais predis põem o paciente com câncer a um estado de hipercoagulabilidade.<sup>86</sup>

Indivíduos previamente hígidos com diagnóstico de trombose venosa profunda (TVP) apresentam risco nove vezes maior do que a população em geral de apresentarem um diagnóstico de câncer nos próximos seis a doze meses, principalmente se acontecer mais de

um episódio no período.<sup>85</sup> Em pacientes com câncer de mama, a incidência de fenômenos trombo-embólicos está relacionada ao estágio da doença, sendo cerca de 0,1% nas pacientes em estágio I e 18% nos estágios III e IV.<sup>86</sup> A partir da década de 90, diversos estudos avaliaram a relação entre o processo de coagulação e o desenvolvimento de tumores malignos. Sorensen e colaboradores<sup>87</sup> demonstraram que pacientes com câncer que apresentaram episódios de trombose venosa apresentavam estágios mais avançados da doença e tiveram pior prognóstico. O estudo coordenado por Zacharski<sup>88</sup> documentou, em trabalho prospectivo randomizado, modificação favorável na sobrevivência de pacientes com tumores de pulmão tratados com anticoagulantes quando comparados aos que não os utilizaram.

O processo normal de coagulação resulta da interação entre diversos fatores: protrombina, cálcio, fibrinogênio e um quarto fator conhecido como tromboplastina ou, fator tecidual (FT).<sup>89</sup>

O fator tecidual é uma glicoproteína transmembrana de 47 kDa, formada por 219 aminoácidos de domínio extracelular, 23 aminoácidos transmembrana e 21 aminoácidos de domínio citoplasmático.<sup>89,90</sup> Sua porção extracelular apresenta regiões para interação com os fatores VII/VIIIa. Essa interação tem função reconhecida no desencadeamento do processo da via extrínseca da coagulação ao dar início à cascata da coagulação através da ativação dos fatores IX e X, os quais proporcionarão a conversão do fibrinogênio em fibrina, formando os coágulos sanguíneos.<sup>91,92</sup>

A molécula do FT é expressa em fibroblastos da adventícia de vasos sanguíneos, cápsulas de órgãos, células epiteliais de pele e mucosas, células do estroma endometrial e astrócitos no sistema nervoso central.<sup>89</sup> Normalmente não é detectável a expressão de fator tecidual em células intravasculares, como o endotélio normal, sugerindo que constitui um envelope hemostático para o caso de ruptura da integridade vascular ou tecidual.<sup>89</sup>

Tecidos embrionários como epitélios, cardiomiócitos, células do endoderma visceral, músculo liso vascular e tecido neural expressam o fator tecidual, especialmente durante períodos de desenvolvimento embrionário no qual os fatores de coagulação não estão presentes ou são incapazes de cruzar a barreira placentária. Carmeliet e colaboradores,<sup>93</sup> em estudos com inativação de genes, demonstraram que a deficiência do FT torna inviável o desenvolvimento de embriões em função de um desenvolvimento vascular comprometido.

Além dessas funções no mecanismo de coagulação, outras situações podem induzir a expressão do FT. A liberação de citocinas inflamatórias (como o fator de necrose tumoral), mitógenos (como VEGF, insulina e fator de crescimento de fibroblastos), hormônios, endotoxinas, infecções virais, hipóxia e trauma mecânico foram também associados a aumento de atividade desta proteína.<sup>93</sup> O FT também desempenha papel importante em uma série de condições patológicas tais como a coagulação intravascular na sepse,<sup>94</sup> arteriosclerose<sup>95</sup> e câncer.<sup>96</sup>

A alta expressão do FT em células tumorais pode ser um dos mecanismos que propiciam estados de hipercoagulabilidade em indivíduos com câncer.<sup>97</sup> A relação direta entre alta expressão de FT e estágios avançados de neoplasias malignas já foi descrita em tumores de mama,<sup>98</sup> pâncreas,<sup>99</sup> pulmão,<sup>100</sup> gliomas,<sup>101</sup> próstata<sup>102</sup> e cólon.<sup>103</sup> Uma explicação para esse fenômeno são os estudos que demonstram que o FT desempenha papel importante no crescimento, invasão e disseminação gerados por trombose<sup>104</sup> e angiogênese.<sup>105</sup>

## **2.6. Relação entre Fator Tecidual e Angiogênese**

O VEGF é considerado, entre os fatores pró-angiogênicos conhecidos, como o iniciador predominante da angiogênese.<sup>60</sup> Diversos estudos,<sup>97,106,107</sup> indicam que o FT apresenta capacidade de estimular a expressão do VEGF e incrementar a angiogênese, a qual

é fundamental para o desenvolvimento tumoral e para a capacidade de produção de metástases. A atividade pró-angiogênica do FT é confirmada pela associação positiva entre sua expressão e o aumento da DMV em várias neoplasias malignas como próstata,<sup>102</sup> mama,<sup>98</sup> pulmão<sup>100</sup> e carcinoma colorretal.<sup>103</sup>

A alteração da atividade do processo de angiogênese resulta de desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos. O FT participa desse processo através do estímulo à produção de VEGF e da supressão da trombospondina, um peptídeo com atividade antiangiogênica.<sup>59</sup> Além disso, Amirkhosravi e colaboradores<sup>108</sup> demonstraram que tanto o VEGF quanto o FT têm a sua expressão aumentada pela hipóxia em tumores.

Duas vias fisiopatológicas diferentes existem para explicar o estímulo pró-angiogênico do FT, sendo uma dependente do mecanismo de coagulação e outra não.<sup>96</sup> A via dependente da coagulação resulta da ativação da trombina através da ligação do FT ao fator VII. A presença de trombina resulta em lise dos fibrinopetídeos A e B a partir da molécula do fibrinogênio, o que determina a conversão deste em fibrina. Níveis plasmáticos elevados de fibrinopeptídeo A foram relacionados ao crescimento tumoral.<sup>96</sup> A presença de trombina também promove ativação de plaquetas, que se unem à fibrina formando o coágulo. Fatores pró-angiogênicos liberados pelas plaquetas, dentre eles o VEGF, contribuem para a migração e a proliferação de células endoteliais. O VEGF, por sua vez, induz o aumento da permeabilidade vascular que determina escape de proteínas plasmáticas, especialmente a fibrina, as quais formarão uma matriz ao redor das células tumorais.<sup>109</sup> A partir desta matriz, que serve como base de migração de células endoteliais e angiogênese tumoral, existe a liberação de novos agentes que estimulam a proliferação vascular, contribuindo para manutenção e aumento do estímulo angiogênico.<sup>110</sup> O mecanismo de incremento à angiogênese não diretamente relacionada à cascata da coagulação foi descrita por Yu e colaboradores.<sup>111</sup> O processo envolve a fosforilação da porção citoplasmática do FT e induz a

formação de uma seqüência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes, entre eles, o fator de crescimento vascular endotelial, resultando em um potente estímulo angiogênico.

O FT desempenha papel importante tanto na angiogênese fisiológica quanto nos processos patológicos. Está bem estabelecido que deficiência de FT em ratos transgênicos causa mortalidade do embrião devido à formação vascular insuficiente.<sup>112</sup> Lesões histopatológicas semelhantes ocorrem em embriões com deficiência de VEGF,<sup>113</sup> sugerindo que o FT e VEGF regulam funções similares. O VEGF tem sua transcrição aumentada pela ativação do FT, levando a potente estímulo angiogênico e à inibição da trombospondina.<sup>114</sup>

A partir da identificação do FT como participante importante do processo tumoral em diversas neoplasias malignas, vários estudos foram desenvolvidos para identificar a sua expressão e correlacioná-la com fatores prognósticos usualmente utilizados.

Seto e colaboradores,<sup>103</sup> analisando espécimes de tumores colo-retais, demonstraram aumento da incidência de metástases hepáticas e pior sobrevida aos três anos nos tumores com expressão mais elevada do fator tecidual. Nakasaki e colaboradores,<sup>115</sup> também avaliando adenocarcinomas de cólon e reto, demonstraram que houve relação entre o estadiamento em graus mais avançados da neoplasia e a expressão do FT.

Poon e colaboradores<sup>116</sup> avaliaram 58 casos de carcinoma hepatocelular, comparando a expressão do FT com densidade microvascular e outros fatores prognósticos. Nesse estudo associou-se positivamente a atividade do FT à maior densidade de vasos sanguíneos e à expressão imunoistoquímica do VEGF nos espécimes tumorais. Além disso, a expressão positiva para FT se relacionou com tumores mais invasivos e estágios clínicos mais avançados, sendo fator prognóstico isolado na análise estatística.

Khorana e Fine,<sup>117</sup> em artigo de revisão, relataram a incidência de fenômenos tromboembólicos em 17% a 57% dos pacientes com câncer de pâncreas e, constataram que as células dessa neoplasia ativam plaquetas e diversos outros fatores pró-coagulantes, sendo o FT um dos principais. A ativação da coagulação poderia estar relacionada ao crescimento tumoral e à angiogênese. Kakkar e colaboradores,<sup>118</sup> em estudo de 55 casos de carcinomas ductais pancreáticos, demonstraram que tumores com grau menor de diferenciação apresentam maior expressão do fator tecidual.

Além dos órgãos do trato gastrointestinal, existem diversos relatos do FT como importante fator prognóstico em outras neoplasias. Hamada e colaboradores,<sup>101</sup> estudando 44 espécimes de gliomas, mostraram relação entre a intensidade da expressão do FT e o grau de diferenciação tumoral. Em seu estudo, todos os gliomas expressaram o FT, porém, enquanto apenas 10% dos gliomas benignos (graus I e II) foram intensamente positivos para FT, 86% dos astrocitomas anaplásicos (grau III) e 95% dos glioblastomas (grau IV) expressaram de forma moderada ou intensa essa proteína.

No adenocarcinoma de próstata, Abdulkhadir e colaboradores<sup>102</sup> demonstraram que a atividade do FT apresentou associação direta com níveis mais elevados de PSA, elemento reconhecido de mau prognóstico nessa neoplasia pelo risco aumentado de recorrência. Além disso, foi também significativamente co-relacionada com a angiogênese do tumor aferida pela densidade microvascular. Tais dados foram confirmados por Akashi e colaboradores,<sup>119</sup> os quais relataram que os pacientes com doença metastática apresentaram alta expressão do FT.

Koomagi e Volm<sup>100</sup> demonstraram a relação entre expressão do FT, intensidade do VEGF e densidade microvascular em neoplasias de pulmão do tipo não pequenas células. Os indivíduos com maior intensidade de expressão do FT também tiveram pior prognóstico e sobrevida menor. O FT foi comparado com a resistência do tumor à droga doxorubicina “*in vitro*”, e os pacientes que não expressavam a proteína foram mais resistentes à droga do que



os que a expressavam. Os autores sugerem que o FT possa ser utilizado como fator prognóstico e preditivo para o tratamento dessa neoplasia.

Contrino e colaboradores<sup>120</sup> determinaram alta expressão do FT em carcinomas de mama, não encontrando tais achados em pacientes com doenças benignas. Vrana e colaboradores<sup>98</sup> encontraram associação significativa entre a presença do FT e a progressão para o carcinoma de mama invasivo.

Wang e colaboradores<sup>121</sup> relataram a importância dos fatores relacionados à coagulação, dentre eles o FT, na progressão e evolução clínica das neoplasias ovarianas de origem epitelial. Análises de DNA demonstraram aumento da atividade de genes relacionados a proteínas de coagulação e à inflamação no peritônio pélvico e em regiões próximas a implantes. Tal expressão demonstrou correlação com atividade proliferativa celular, potencial de invasão, angiogênese, produção de ascite e metástases. Os autores também propuseram que estudos sobre o bloqueio das rotas de coagulação e inflamação poderão propiciar novas alternativas para terapêutica nesses tumores.

Poucos estudos foram realizados contemplando a relação entre o fator tecidual e o câncer de estômago. Um relato esporádico sugeriu que a produção do FT pode estar relacionada com complicações pulmonares em paciente com adenocarcinoma gástrico.<sup>122</sup> Jiao e colaboradores,<sup>123</sup> em pesquisa comparativa de oitenta espécimes de carcinoma com vinte obtidos de pacientes com tecido normal, demonstraram que a positividade para o FT, VEGF e DMV é significativamente maior nos pacientes com neoplasia maligna. Avaliação “*in vitro*” de espécimes de câncer gástrico humano mostrou que nem todas as linhagens tumorais apresentam expressão elevada de FT, porém as associadas com maior expressão de FT e VEGF podem ser manipuladas, e, o bloqueio do excesso de vascularização pode ser obtido.<sup>124</sup>

**A expressão seletiva do FT em células tumorais e no endotélio vascular torna-o alvo interessante para tratamentos dirigidos. Hu e Garen<sup>125</sup> desenvolveram um**

**tratamento molecular capaz de seletivamente localizar e destruir, em ratos, células tumorais que expressavam o FT em modelo de melanoma humano. Nilsson e colaboradores<sup>126</sup> obtiveram trombose seletiva e morte de células tumorais em modelos de teratocarcinoma, adenocarcinomas de cólon e sarcomas de ratos, através do uso de anticorpos específicos. Tal estratégia de tratamento produziu diminuição significativa dos tumores, embora o tecido residual tenha permitido recidiva tumoral.**

A busca de medicamentos, tendo como alvo o complexo FT-FVIIa, poderia proporcionar melhora no tratamento com drogas de efeito angiostático,<sup>127</sup> pois apresenta-se como estratégia inovadora interessante para o tratamento de pacientes com câncer. Como o FT, entre outros fatores da cascata da coagulação, é fator importante na indução da angiogênese, sua inativação pode ajudar no controle do câncer, alterando sua progressão, reduzindo a incidência de TVP e melhorando tanto a sobrevida como a qualidade de vida desses pacientes.

### 3. OBJETIVOS

1- Descrever a expressão imunoistoquímica do fator tecidual em tecidos neoplásicos obtidos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa por adenocarcinoma gástrico.

2- Correlacionar a expressão imunoistoquímica do fator tecidual com o grau de angiogênese tumoral, aferido pela densidade microvascular.

3- Correlacionar a intensidade da expressão imunoistoquímica do fator tecidual e a densidade microvascular com fatores prognósticos e com a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma gástrico.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Delineamento, População e Amostra

Para a realização do presente trabalho, foi desenvolvido estudo de coorte histórico, com componentes contemporâneos, que incluiu pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, atendidos no Hospital São Lucas da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Cirurgias realizadas no período compreendido entre os anos de 2000 a 2003 foram revisadas, e os dados obtidos foram analisados a partir de acompanhamento realizado pelo autor no atendimento desses pacientes durante a internação e no período pós-operatório realizado nos ambulatórios de Cirurgia Geral e Cirurgia do Aparelho Digestivo da instituição. Todos os pacientes foram acompanhados até o momento do óbito ou até apresentarem seguimento mínimo de 24 meses após a data do procedimento cirúrgico.

Para análise das variáveis principais do estudo (expressão do fator tecidual e densidade microvascular), utilizaram-se espécimes de tumores gástricos armazenados no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS na forma de blocos de parafina. O material coletado foi avaliado pelo pesquisador e por patologista quanto à representatividade da neoplasia através de corte e coloração com hematoxilina-eosina. As informações referentes aos achados anátomo-patológicos foram as obtidas na análise dos espécimes ressecados e utilizados para a definição do estadiamento clínico-patológico realizado imediatamente após as intervenções cirúrgicas. Tais dados foram coletados de modo prospectivo e mantidos em banco de dados pelo autor.

## 4.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídos os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica com intenção curativa por adenocarcinoma gástrico atendidos consecutivamente no período de janeiro de 2000 até dezembro de 2003 nos Serviços de Cirurgia Geral e Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital São Lucas da PUCRS.

## 4.3. Critérios de Exclusão

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

- ressecção incompleta da neoplasia, caracterizada por evidência de doença residual;
- número de linfonodos ressecados menor do que 15;
- espécimes de anatomia patológica sem condições para as análises histológicas apropriadas;
- pacientes submetidos previamente a tratamento rádio e / ou quimioterápico;
- pacientes com diagnóstico ou tratamento prévio de outra neoplasia.

## 4.4. Variáveis em Estudo

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

- Idade.
- Sexo.

- Localização do tumor no estômago

Foi registrada a localização descrita pelo cirurgião e confirmada pelos achados do patologista. As localizações utilizadas foram: terço proximal que corresponde aos tumores localizados nas regiões do fundo e da cárdia, terço médio que identifica os tumores localizados na região do corpo, terço distal que se refere aos localizados nas regiões do antro e piloro, e coto gástrico para os pacientes submetidos a gastrectomia ou gastrojejunostomia prévia por doença comprovadamente benigna.<sup>128</sup>

- Estadiamento dos tumores

O estadiamento utilizado foi o da classificação da UICC de 2002<sup>35</sup> e apresentado nos quadros 2 a 5.

### **Quadro 2. Invasão do tumor na parede gástrica (Categoria T).**

<b>Estágio</b>	
Tis	Limitado à mucosa, sem penetrar a membrana basal.
T1a	Limitado à mucosa com invasão da lâmina própria.
T1b	Invasão da camada submucosa.
T2a	Invasão da camada muscular própria.
T2b	Invasão da subserosa.
T3	Penetração da serosa sem invasão de tecidos adjacentes
T4	Invasão de tecidos adjacentes e/ou outros órgãos.

### **Quadro 3. Invasão linfonodal (Categoria N).**

<b>Estágio</b>	
N0	Sem envolvimento linfonodal.
N1	1-6 linfonodos invadidos.
N2	7-15 linfonodos invadidos.
N3	> 15 linfonodos invadidos.

**Quadro 4. Metástases a distância (Categoria M).**

<b>Estágio</b>	
M0	Sem metástases a distância.
M1	Com metástases a distância.

**Quadro 5. Estadiamento anátomo-patológico (pTNM).**

Estágio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
IB	T2	N0	M0
II	T1	N2	M0
II	T2	N1	M0
II	T3	N0	M0
IIIA	T2	N2	M0
IIIA	T3	N1	M0
IIIA	T4	N0	M0
IIIB	T3	N2	M0
IIIB	T4	N1	M0
IV	T4	N2	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

- Grau de diferenciação do tumor

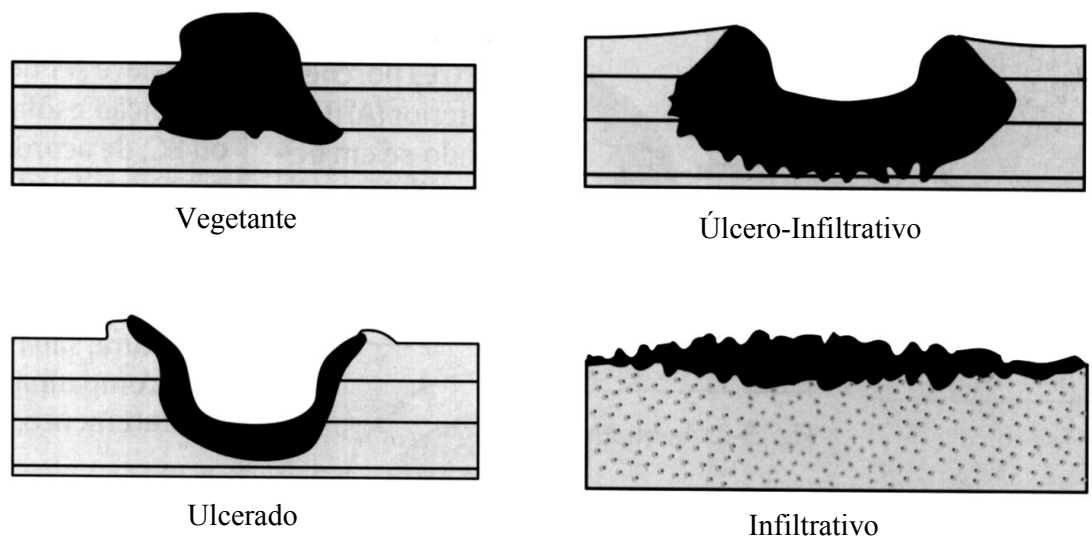
Os tumores foram classificados de acordo com o grau de diferenciação fornecido pelo patologista, o qual variou desde câncer bem diferenciado (G1) até casos com tumores indiferenciados (G4), com dois graus intermediários (G2 e G3).<sup>35</sup>

- Classificação de Lauren

De acordo com a classificação proposta por Lauren,<sup>129</sup> os tumores foram divididos em três grupos: intestinal, difuso ou misto.

- Apresentação macroscópica do tumor

Os tumores avançados foram classificados em vegetantes, ulcerados, úlcero-infiltrativos e infiltrativos, conforme modificação realizada em 1979 da classificação utilizada por Borrmann, proposta por diversos autores<sup>130</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Formas de apresentação macroscópica dos tumores avançados.**

- Tempo de seguimento, definido como o tempo decorrido entre a operação e a última consulta de revisão ou a data do óbito.
- Sobrevida.

#### 4.5. 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 da 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 de Porto Alegre.

#### **4.6. Imunoistoquímica**

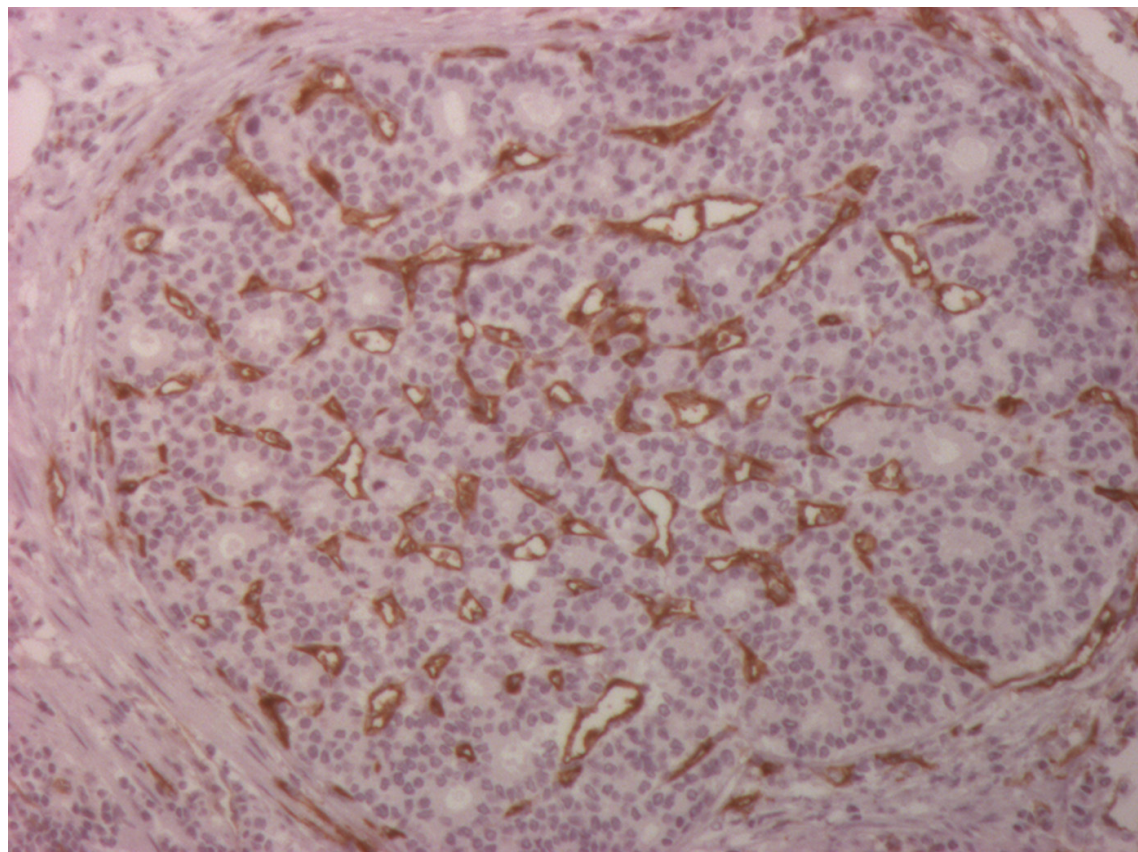
A partir dos tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina das peças tumorais selecionadas, cortes com espessura de 3 µm foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20 mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena 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-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (*background*). As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-Fator 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 anti-CD34 (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'-diaminoazobenzidina (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.

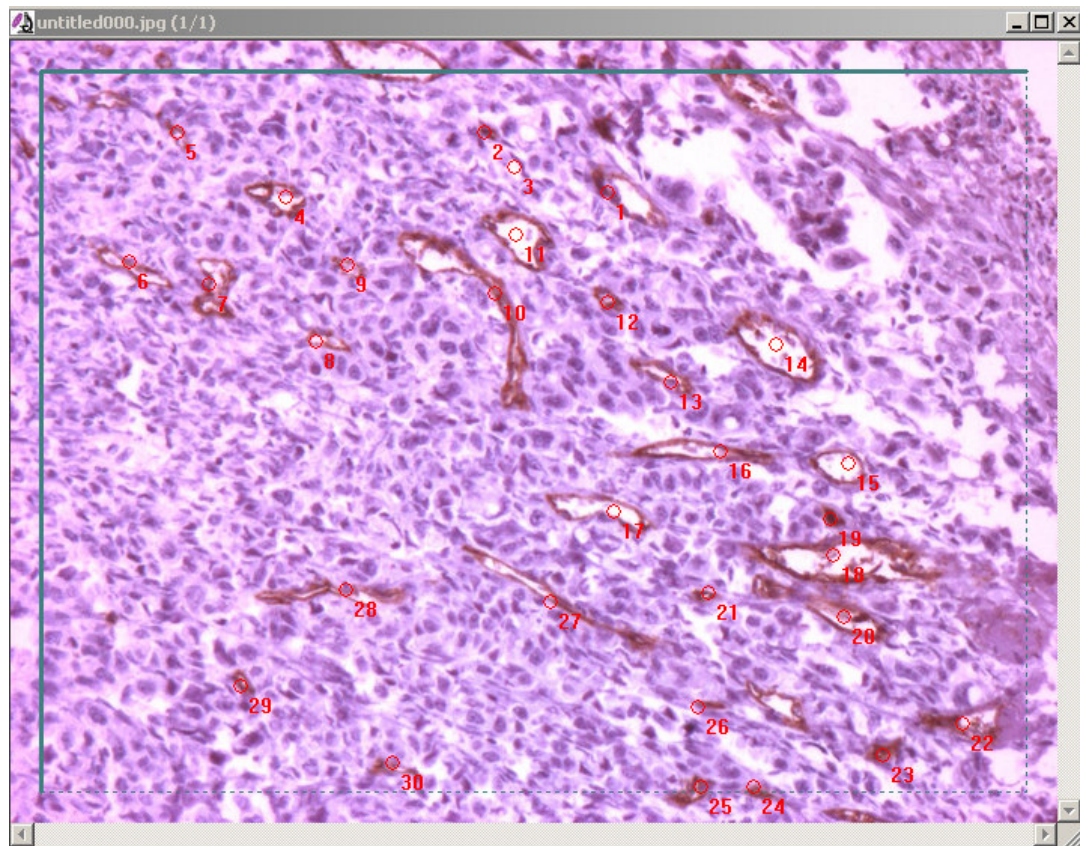
#### 4.7. Densidade Microvascular

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. Foram realizados controles negativos em tecido gástrico não-neoplásico, que não expressaram os antígenos em estudo. Controles positivos em tecido de carcinoma prostático confirmaram a reatividade dos marcadores. A identificação da microvascularização foi realizada através da seleção dos pontos mais vascularizados, preferencialmente na região periférica do tumor, examinadas 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 vinte campos diferentes para a contagem dos vasos com uma magnificação de 400X (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 2). Todas as células endoteliais coradas, separadas de microvasos adjacentes, foram contadas como um vaso. Não eram necessárias a identificação de luz vascular ou a presença de células sangüíneas. 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 dentro da área da grade, ou que tocassem a linha de demarcação pontilhada (Figura 3) como preconizado por Gundersen e colaboradores.<sup>131</sup> A contagem foi realizada em uma escala ordinal e,

posteriormente, foi realizada a média aritmética dos vinte campos selecionados em cada paciente.



**Figura 2. Coloração de microvasos (marrom) por anticorpos anti-CD 34 em secção tumoral (magnificação de 100X).**

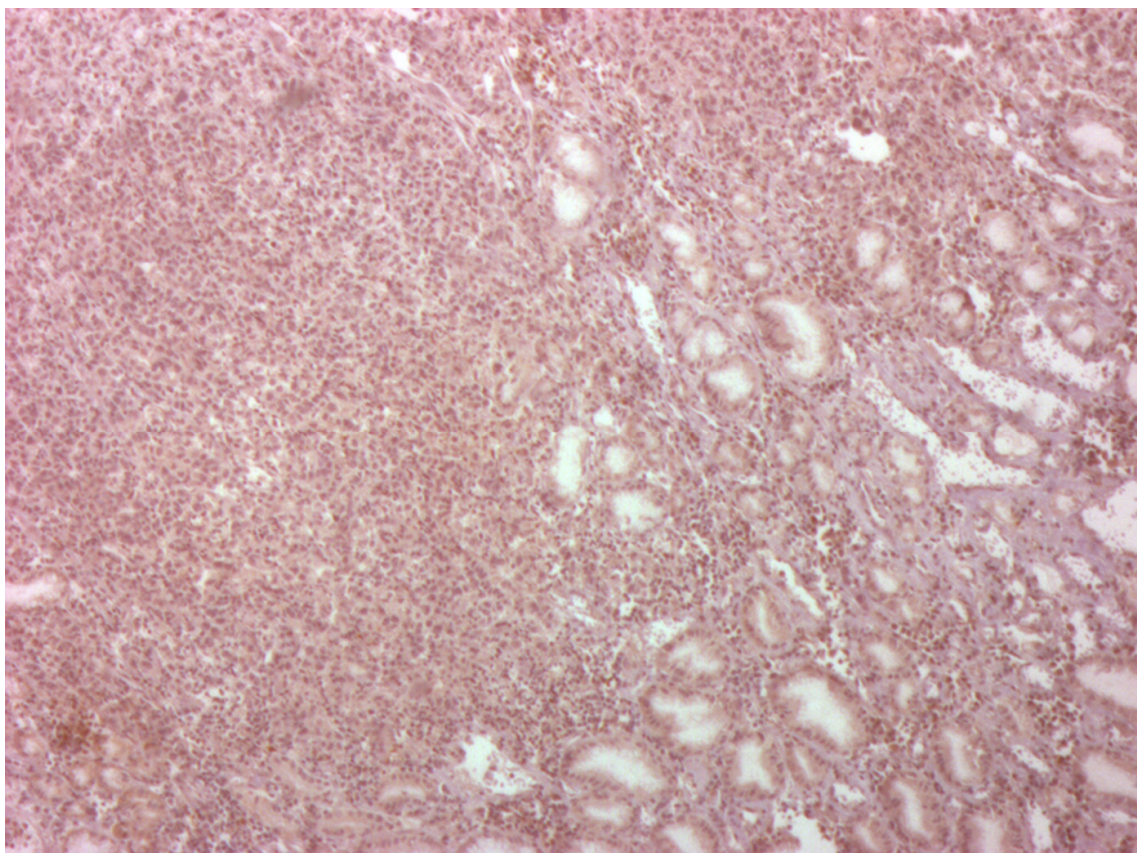


**Figura 3.** Imagem obtida no programa após a inserção de grades de correção para contagem dos microvasos (magnificação de 400X).

#### **4.8. Expressão do Fator Tecidual**

A quantificação da expressão do FT foi avaliada através da reatividade para o anticorpo, utilizando-se para aferição uma lente objetiva com magnificação de 100x. A expressão do FT foi classificada em quatro categorias: 1 (0 a 25% das células com carcinoma

coradas), 2 (26% a 50% das células com carcinoma coradas), 3 (51% a 75% das células com carcinoma coradas) ou 4 (76% a 100% das células com carcinoma coradas).(Figuras 4 e 5).



**Figura 4. Adenocarcinoma gástrico com menos de 25% das glândulas coradas. Categoria 1 (magnificação de 50X).**

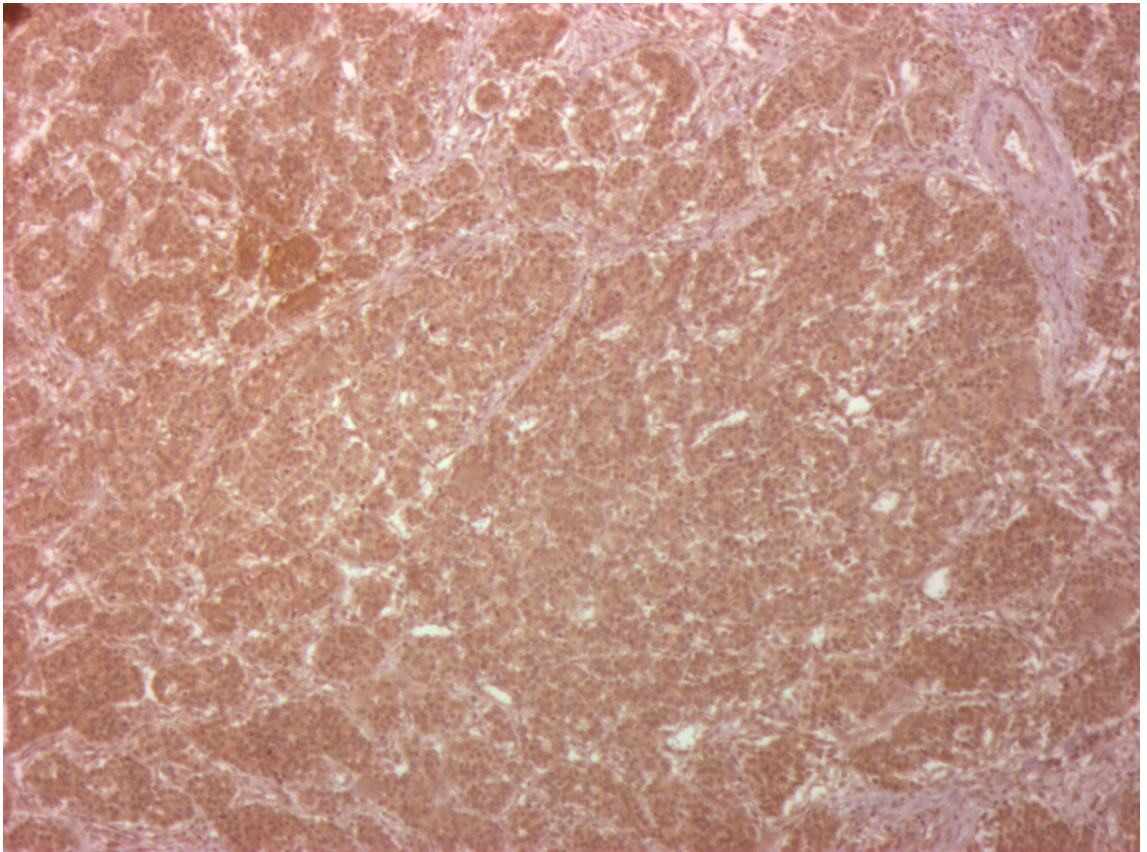


Figura 5. Adenocarcinoma gástrico com praticamente todas as glândulas coradas. Categoria 4 (magnificação de 50X).

#### 4.9. Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através de médias e desvios padrão. Para as variáveis qualitativas, utilizaram-se percentuais. As comparações entre grupos dos dados quantitativos foram realizadas através do teste *t* de Student. Para os dados qualitativos, a comparação foi pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou exato de Fisher quando apropriado.

A análise da sobrevida dos pacientes foi calculada utilizando-se o método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas pelo teste de *log-rank*. As variáveis consideradas de relevância clínica para a sobrevida foram selecionadas como fator de ajuste para uma análise de regressão multivariável (regressão por modelo de Cox) subsequente. Assim, foi possível obter a contribuição independente de cada variável selecionada.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas Excel e SPSS v 12.0 para Windows. Os níveis para considerar diferenças estatisticamente significativas foram de 5% ( $P < 0,05$ ).

#### **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), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Protocolo nº 345/06.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da Amostra

No período de janeiro de 2000 a dezembro de 2003, foram realizadas 101 ressecções por adenocarcinoma gástrico no Departamento de Cirurgia do Hospital São Lucas da PUCRS. Desses pacientes, 50 (49,5%) preencheram os critérios de inclusão deste estudo. As principais causas para exclusão foram o número de linfonodos menor do que quinze em 32 pacientes e a ressecção com doença residual em dezesseis pacientes. Em três pacientes não foi possível a localização dos blocos de parafina para realização do estudo imunoistoquímico. Dos 50 pacientes, 4 (8%) foram excluídos dos estudos de sobrevida por evoluírem para óbito durante a internação (mortalidade pós-operatória precoce), sendo considerados apenas para estudo de prevalência.

A média de idade dos pacientes estudados foi de 62,9 anos (DP=11,3), sendo 38 indivíduos do sexo masculino e 12 do sexo feminino. A localização mais comum do tumor foi no terço médio do estômago (18 casos), seguido dos terços proximal (14 casos) e distal (13 casos). O tamanho médio do tumor foi de 6,51 cm ( $\pm 4,14$ ), medindo o menor 0,7 cm e o maior 20 cm no maior diâmetro. Na forma de apresentação macroscópica do tumor, o tipo mais comum foram lesões úlcero-infiltrativas da classificação de Borrmann. Quanto ao grau de diferenciação histológica das neoplasias, adenocarcinomas moderadamente diferenciados (G2) foram mais freqüentemente observados, representando 46% da amostra.

A maioria dos pacientes (96%) apresentava tumores com invasão da camada muscular, caracterizados como avançados, sendo que, em 39 casos (78%) a lesão já atingia a serosa ou invadia os órgãos adjacentes, o que caracteriza a agressividade dessa neoplasia. Em 33 (66%)



dos casos havia comprometimento de, pelo menos, um linfonodo. Dois pacientes (4%) apresentaram metástases a distância no momento da operação, um no lobo esquerdo do fígado e outro, implante único no intestino delgado, as quais foram ressecadas em conjunto com a lesão gástrica.

As principais características clínicas e patológicas dos pacientes estudados estão demonstradas nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1. Características clínicas e patológicas da população estudada (N=50).**

Média de idade [ $\pm$ DP] quando da operação (anos)	62,9 [ $\pm$ 11,3]
Sexo (Masculino:Feminino)	3,1:1
Tamanho tumor ( $\pm$ DP) cm	6,5 ( $\pm$ 4,1)
Localização do tumor	
Terço Proximal	14 (28%)
Terço Médio	18 (36%)
Terço Distal	13 (26%)
Todo o órgão	3 (6%)
Coto gástrico	2 (4%)
Classificação de Borrmann	
0	2 (4%)
1	0 (0%)
2	15 (30%)
3	19 (38%)
4	14 (28%)
Classificação de Lauren	
Intestinal	20 (40%)
Difuso	21 (42%)
Misto	9 (18%)
Grau de diferenciação microscópica	
G1	1 (2%)
G2	23 (46%)
G3	17 (34%)
G4	9 (8%)

**Tabela 2. Estadiamento TNM da população estudada (N=50).**

Estágio T	
1	2 (4%)
2	9 (18%)
3	30 (60%)
4	9 (18%)
Estágio N	
0	17 (34%)
1	15 (30%)
2	9 (18%)
3	9 (18%)
Estágio M	
0	48 (96%)
1	2 (4%)
Estadiamento final	
I	10 (20%)
II	5 (10%)
III	17 (34%)
IV	18 (36%)

## 5.2. Densidade Microvascular

O número de microvasos por campo variou de 16,5 a 105, sendo a DMV média de 48,72 ( $\pm 19,06$ ). A mediana da DMV foi 45 microvasos por campo, sendo este valor utilizado como ponto de corte para divisão em dois grupos, com maior e menor vascularização. Foi realizada uma análise univariada da relação entre o número de vasos e as principais variáveis em estudo. Não houve relação estatisticamente significativa entre o número de vasos com nenhum dos fatores em estudo, sendo os dados detalhados descritos na tabela 3.

**Tabela 3. Relação entre as características clínico-patológicas e a densidade microvascular.**

Variável	<45vasos/campo	≥45vasos/campo	P
	n=26	n=24	
Idade (anos)	62,9 ±11,9	63,0 ±10,9	0,70
Tamanho tumor (cm)	6,78 ±6,8	6,26 ± 3,6	0,98
Borrmann IV	8(30,8)	6(27,3)	0,99
Lauren difuso	9(34,6)	12(24)	0,42
T3- T4	16(66,7)	23(88,5)	0,13
Linfonodos +	19(73,1)	14(58,3)	0,42
G3-G4	10(38,5)	16(66,7)	0,09
Estágios III-IV	21(80,8)	14(58,3)	0,16

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ou frequências (percentual)

### 5.3 Expressão do Fator Tecidual

Foi observada intensa imunorreatividade para o fator tecidual na maioria das células tumorais, sendo que todos os tumores avaliados expressaram a proteína (100%). Para quantificação da expressão do FT, foi avaliada a área da superfície das glândulas malignas que mostrava reatividade em relação ao epitélio adjacente. Trinta e nove (78%) dos casos apresentaram alta coloração (tabela 4). Em função do pequeno número de pacientes alocados nos demais grupos e da polarização observada na intensidade da expressão do FT, para melhor análise estatística, os casos incluídos nos grupos 1, 2 e 3 foram estudados em conjunto, formando um novo grupo (0-75% das glândulas positivas para FT), sendo, então,

para a análise, categorizados os resultados em dois grupos: baixa expressão (escores 1 a 3) e alta expressão (escore 4).

**Tabela 4. Expressão do fator tecidual em espécimes de adenocarcinoma gástrico.**

Escore Fator Tecidual	Número de amostras (%)
1 (0-25%)	2 (4)
2 (26-50%)	5 (10)
3 (51-75%)	4 (8)
4 (76-100%)	39 (78)

Foram também examinadas as relações entre a expressão do FT categorizadas e os indicadores prognósticos conhecidos do adenocarcinoma gástrico, como tamanho da lesão, classificação de Borrmann e Lauren, invasão da parede gástrica (T), presença de linfonodos comprometidos, estadiamento final e grau de diferenciação celular do tumor. Não houve correlação estatística entre a expressão do FT e nenhum desses fatores prognósticos (Tabela 5).

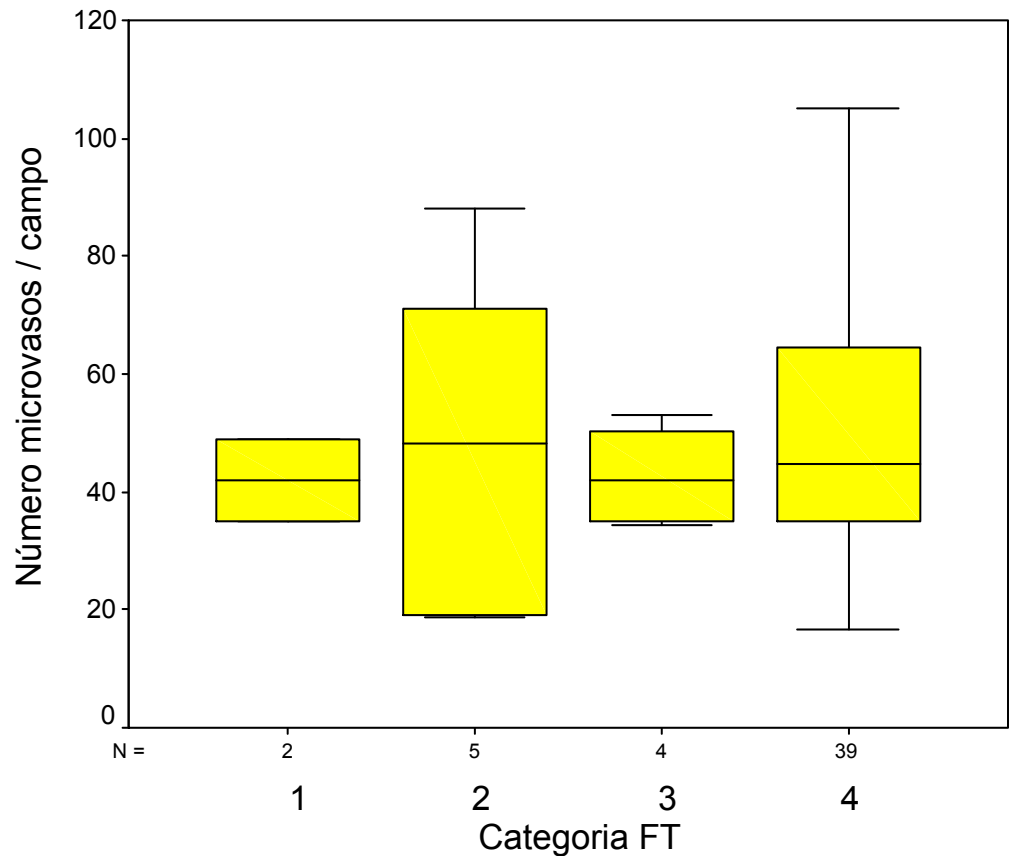
**Tabela 5. Relação entre as características clínico-patológicas e a expressão do fator tecidual.**

Variável	Expressão baixa FT n=11	Expressão alta FT n=39	P
Idade (anos)	64,8 ±8,5	62,4 ±12	0,54
Tamanho tumor (cm)	6,8 ±3,2	6,4 ±4,5	0,78
Borrman IV	3(27,3)	11(29,7)	0,99
Lauren difuso	8(72,7)	13(33,3)	0,47
T3- T4	10(90,9)	29(74,4)	0,45
Linfonodos +	10(90,9)	23(59,0)	0,11
G3-G4	8(72,7)	18(46,2)	0,22
Estágios III-IV	10(90,9)	25(64,1)	0,18

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ou frequências (percentual)

#### 5.4. Relação entre expressão do Fator Tecidual e Densidade Microvascular

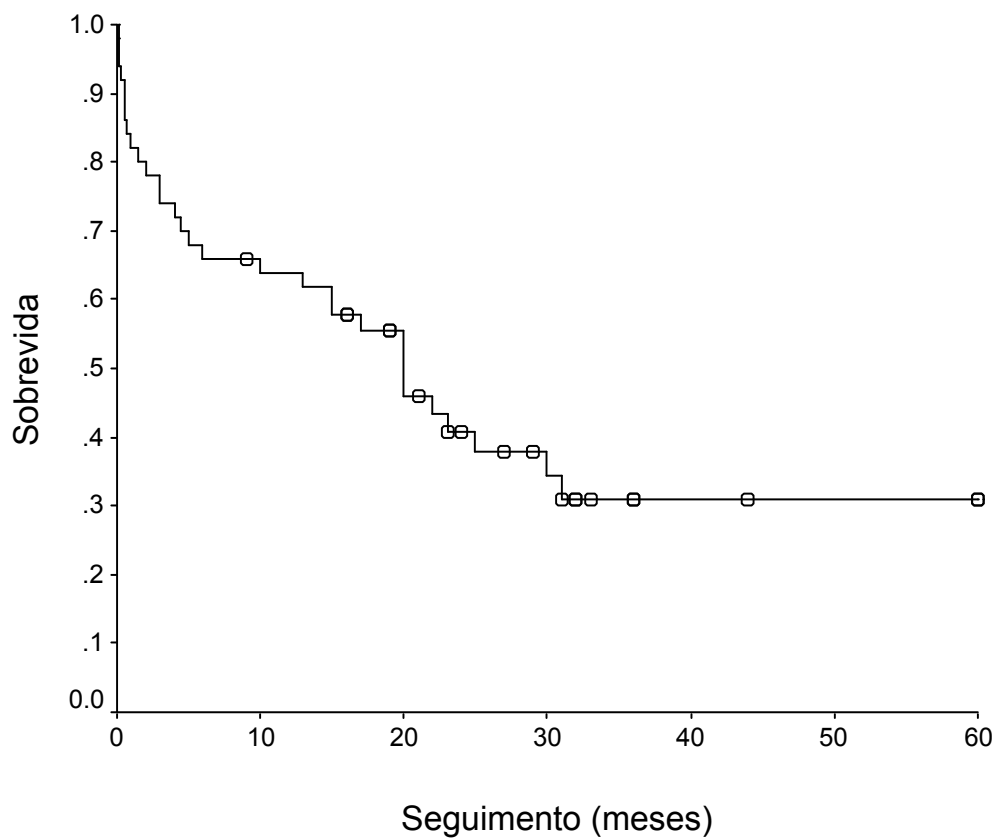
Para a análise da regulação da expressão do fator tecidual exercida sobre a angiogênese nas células tumorais, foi realizada comparação do número de microvasos nas áreas de tumor com a expressão do fator tecidual nas lâminas de secção adjacente. Nos casos com baixa expressão (grupos 1 a 3), a média da contagem de microvasos por campo de grande aumento foi de 46,3 ( $\pm 20,4$ ). Nos casos com alta expressão (grupo 4), a média da contagem foi de 49,9 ( $\pm 19,5$ ). A análise comparativa entre a categoria do Fator tecidual e a o número de microvasos por campo não se mostrou estatisticamente significativa. (figura 6).



**Figura 6. Comparação entre a expressão do FT e a densidade microvascular.**

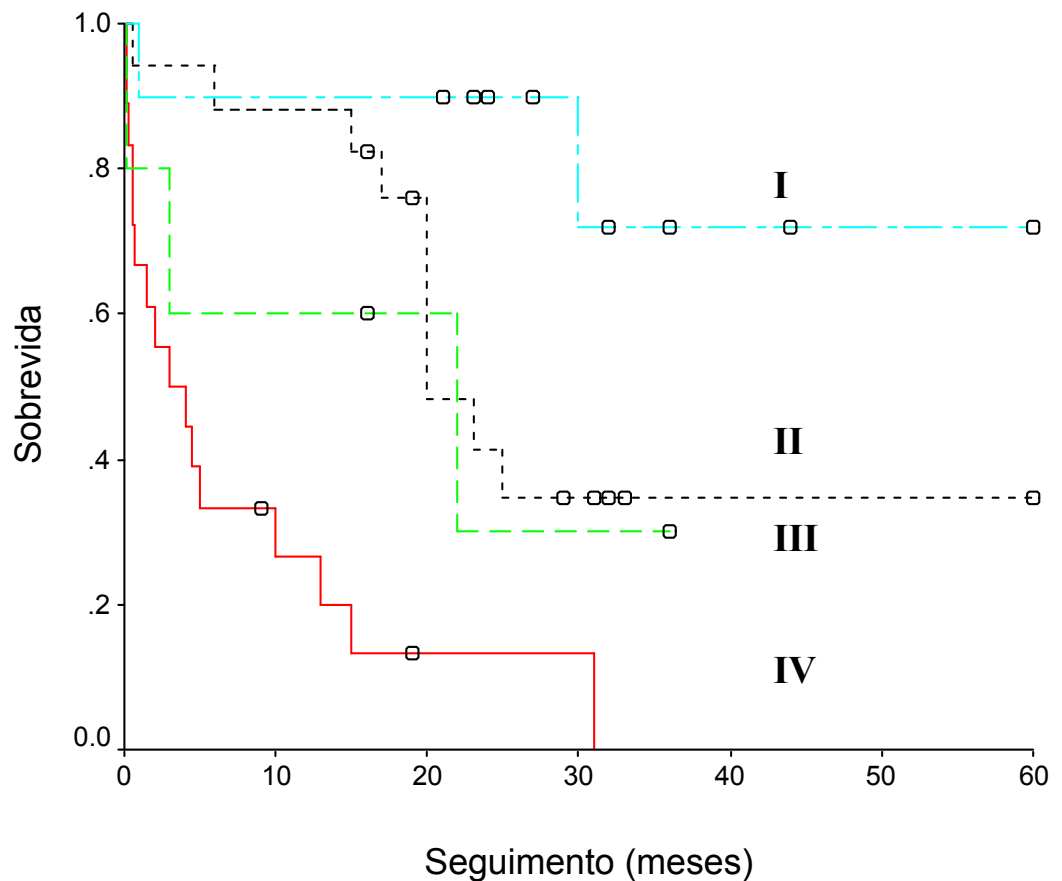
### 5.5. Análise da Sobrevida

O tempo de seguimento médio foi de 28,9 meses, com variação de 1 a 60 meses. Apenas 19 (38%) dos 50 pacientes encontravam-se vivos ao final do estudo. Dos 31 óbitos, 4 (8%) resultaram de mortes relacionadas a complicações pós-cirúrgicas e os demais à recorrência tumoral. Em 22 pacientes foi possível identificar o sítio de recidiva que resultou no óbito: carcinomatose peritoneal em doze, fígado em três, fígado e peritônio em três, anastomose em dois, pulmão em um e baço em um paciente. A curva de sobrevida global dos pacientes está demonstrada na figura 7.



**Figura 7. Curva de sobrevida geral dos pacientes.**

A sobrevida dos pacientes foi diretamente relacionada ao estágio da doença como está representado na figura 8.



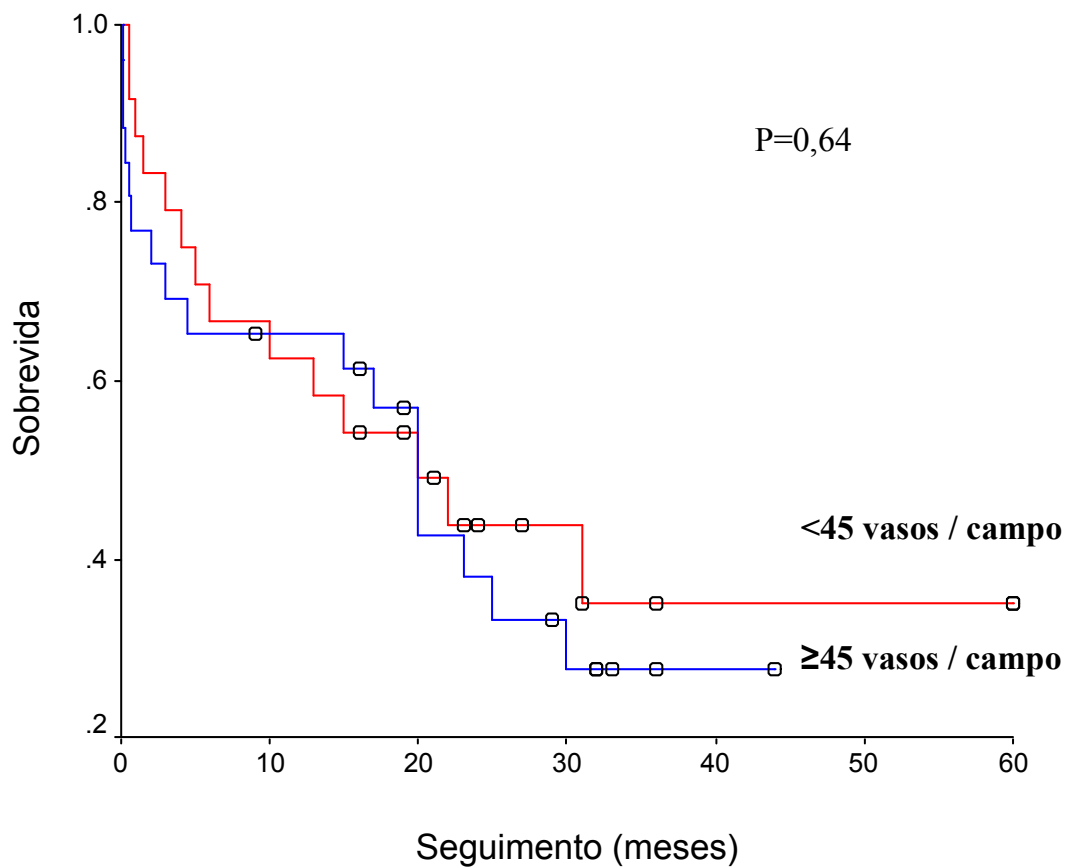
**Figura 8. Curvas de sobrevida por estágio do câncer gástrico.**

Os pacientes do grupo com menor densidade microvascular apresentaram sobrevida média de 29,5 meses (IC=18,8-40,35; EP=5,4), enquanto, para os pacientes com densidade maior, a média foi de 23,4 meses (IC=16,5-30,3; EP=3,5). Essa diferença não apresentou significância estatística ( $P=0,92$ ).

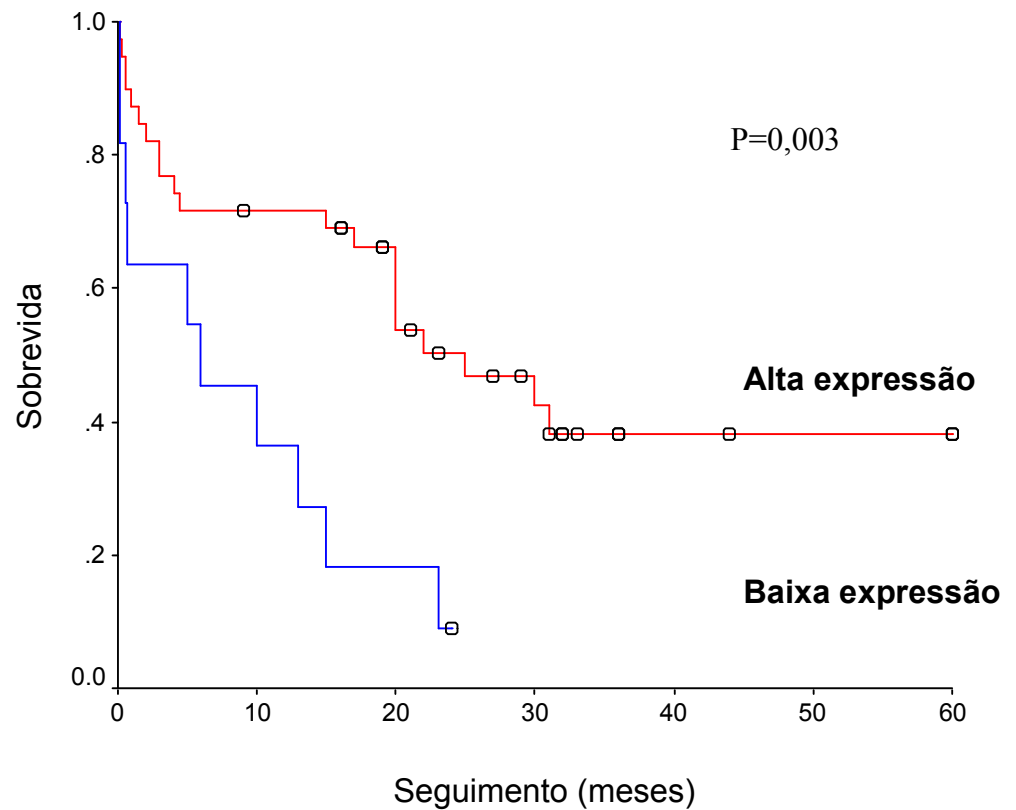
Os pacientes com alta expressão para o fator tecidual apresentaram sobrevida média de 33,6 meses (IC=25,3-41,9; EP=4,2), enquanto, para os pacientes com baixa expressão, a média foi de 9,74 meses (IC=4,51-14,97; EP=2,6). Esse resultado foi estatisticamente significativo ( $P=0,0017$ ).



Curvas de sobrevida analisadas pelo método de Kaplan-Meier foram realizadas para comparar a sobrevida dos pacientes com maior e menor microdensidade vascular (figura 9) e para os pacientes com baixa e alta expressão do FT (figura 10).



**Figura 9. Curvas de sobrevida para pacientes com alta ( $\geq 45$  vasos / campo) e baixa ( $< 45$  vasos / campo) densidade microvascular.**



**Figura 10. Curvas de sobrevida para pacientes com alta ( $\geq 45$  vasos / campo) e baixa ( $< 45$  vasos / campo) intensidade de expressão imunoistoquímica do fator tecidual.**

### 5.6. Análise Multivariada

Como o fator tecidual mostrou ser um fator estatisticamente significativo para a sobrevida, foi realizada uma análise de regressão multivariável ajustada para os principais fatores prognósticos conhecidos no adenocarcinoma gástrico. Nessa análise, a densidade microvascular e a expressão do fator tecidual não influenciaram na sobrevida dos pacientes quando ajustados pela idade, estágio do tumor, grau de diferenciação tumoral, classificação de Lauren e Borrmann. (Tabela 6).

**Tabela 6. Análise de regressão multivariável correlacionando sobrevida com densidade microvascular e expressão do fator tecidual.**

Variável	HR*	IC 95%	P
≥45 vasos/campo	0.46	0,17 a 1,20	0,11
Expressão > 75% Fator Tecidual	0.58	0,21 a 1,56	0,28

\* *Hazard Ratio* (razão de azares)

Obtido em modelo de Cox ajustado para idade, estadiamento, grau de diferenciação celular, classificação de Lauren e Borrmann.

## 6. DISCUSSÃO

A ressecção cirúrgica é o único tratamento que possibilita a cura do adenocarcinoma gástrico. No entanto, a propensão dessa neoplasia para disseminação local, ganglionar e hematogênica dificulta a possibilidade do diagnóstico precoce e impossibilita o procedimento cirúrgico curativo em cerca de metade dos pacientes.<sup>11</sup> O mau prognóstico da doença, devido ao alto índice de recorrência tumoral e a baixas taxas de cura com os tratamentos convencionais, justifica as pesquisas em busca de novas alternativas terapêuticas.

O perfil epidemiológico dos pacientes no presente estudo, com predominância de indivíduos do sexo masculino acima dos 60 anos, é concordante com outros centros de referência no Ocidente.<sup>26,41,52</sup> Como esta pesquisa foi realizada em hospital terciário, com pacientes encaminhados para tratamento cirúrgico, inferências epidemiológicas outras são difíceis de avaliar. No entanto, apesar do declínio da incidência em países desenvolvidos, o adenocarcinoma gástrico permanece como uma das maiores causas de morbi-mortalidade por câncer no Brasil, conforme dados levantados pelo Instituto Nacional do Câncer.<sup>5</sup>

Apesar de levantamentos mostrarem que na Europa<sup>33</sup> e nos Estados Unidos<sup>30</sup> exista tendência à localização mais proximal da neoplasia no estômago, no presente estudo houve predominância dos tumores nos terços distais do órgão. Esses dados foram corroborados por pesquisa anterior com 160 pacientes, realizada nesta instituição, onde apenas 29 (18,1%) tumores estavam localizados no terço proximal do estômago.<sup>132</sup> Mesmo que não apresente valor prognóstico,<sup>133</sup> a localização da lesão no órgão é importante, pois definirá o tipo de ressecção, a retirada de outros órgãos, a extensão da linfadenectomia e o tipo de reconstrução

do trânsito digestivo a ser empregado, fatores que podem implicar em maior morbidade e mortalidade associadas ao procedimento.<sup>134</sup>

O estágio do tumor no momento do diagnóstico é o fator mais importante para prognóstico.<sup>135</sup> Infelizmente, constata-se o grau avançado dos tumores neste estudo quando se observa que apenas em dois pacientes a neoplasia foi classificada como precoce. Além disso, em mais da metade dos casos já havia comprometimento metastático dos linfonodos regionais. Esses dados confirmam as dificuldades para o diagnóstico precoce nos estudos publicados no Brasil,<sup>7,10,132,136</sup> assim como praticamente em todos os trabalhos publicados no Ocidente.<sup>18,30,41,135</sup> Além da importância no prognóstico, o estágio influencia na morbidade, pois lesões mais avançadas devem ser tratadas com procedimentos de maior porte e, portanto, mais sujeitas a complicações. No presente estudo, a maioria dos pacientes apresentava tumores em estágio III ou IV, o que demonstra o grau avançado da doença no momento do diagnóstico e pode explicar a alta mortalidade operatória (8%) desta série. Siewert e colaboradores<sup>11</sup> descrevem que os principais fatores de risco para mortalidade operatória são a presença de doenças concomitantes, as metástases linfonodais, o tamanho do tumor, a experiência do grupo de cirurgiões e a idade. Dados previamente publicados pelos autores demonstraram que tumores em estágios III e IV apresentam mortalidade operatória cinco vezes maior do que os classificados em estágios I e II, sendo o principal fator de risco para esse desfecho.<sup>132</sup>

Entre todos os fatores prognósticos utilizados na avaliação do adenocarcinoma gástrico, a penetração na parede gástrica e a presença de linfonodos comprometidos são os de maior importância.<sup>137</sup> A partir desses elementos é que o estadiamento TNM será definido. A análise das curvas de sobrevida dos pacientes do presente estudo (figura 8) mostra que a sobrevida dos pacientes está diretamente relacionada ao estágio da doença, e confirma o comportamento esperado para os pacientes da amostra. O bom resultado em termos de cura

apresentado pelos portadores de lesões em estágios iniciais, deve estimular a identificação de pacientes para avaliação endoscópica com a finalidade de incrementar o diagnóstico em indivíduos com tumores precoces. Como a taxa de incidência do adenocarcinoma gástrico no Brasil não justifica o rastreamento com exames endoscópicos ou radiológicos de toda a população,<sup>31</sup> políticas de saúde pública que identifiquem indivíduos em situação de risco para essa neoplasia são necessárias.

As neoplasias epiteliais são geralmente classificadas conforme o grau em bem, moderado ou pouco diferenciadas. Esse é um relato rotineiro fornecido pelos patologistas, entretanto, a relevância prognóstica desse achado ainda não foi bem estabelecida.<sup>138</sup> Embora o grau moderadamente diferenciado (G2) tenha sido o mais encontrado nesta série, o impacto prognóstico desses achados ainda não está bem elucidado.

A análise de outros fatores de mau prognóstico, como a presença de 66% de tumores classificados como Borrmann III ou IV, ou seja, com características de infiltração na parede gástrica, podem explicar a baixa sobrevida dos pacientes portadores dessa neoplasia. A classificação de Lauren para o câncer de estômago em tipo intestinal e difuso tem recebido especial atenção em função de sua relativa simplicidade e aplicabilidade. A importância do tipo histopatológico na análise epidemiológica do câncer gástrico resulta do fato de que o tipo intestinal é mais freqüente em áreas onde o risco de desenvolver a doença é mais elevado, enquanto o tipo difuso tem freqüência similar em áreas de alto e baixo risco. Existe proposição de que os tumores gástricos do tipo intestinal e do tipo difuso são, na realidade, doenças distintas, com características próprias e fatores de risco específicos.<sup>139</sup> Apesar de estudo realizado no INCA sugerir decréscimo na incidência dos tumores intestinais no Rio de Janeiro,<sup>140</sup> levantamento com mais de 600 pacientes em São Paulo revelou prevalência do tumor do tipo intestinal em mais de 60 % dos casos.<sup>141</sup> Chama a atenção o baixo número de

tumores do tipo intestinal neste estudo (40%), tendo em vista que, tradicionalmente, nas neoplasias gástricas no Brasil, este é o tipo histológico predominante.

Ao contrário do tumor de cólon, no qual as correlações entre anormalidades genéticas e alterações fenotípicas seqüenciais permitem o entendimento dos fenômenos seqüenciais para o desenvolvimento da neoplasia, o adenocarcinoma gástrico exibe heterogeneidade nas alterações histopatológicas que impedem seu delineamento molecular completo.<sup>142</sup> Poucos genes foram relacionados com o desenvolvimento do câncer gástrico de maneira consistente<sup>143</sup> e, dentre eles, a caderina-E parece estar definitivamente associada como marcador do câncer gástrico difuso hereditário.<sup>23,24</sup> Mais de 90% dos adenocarcinomas gástricos, contudo, são esporádicos e a seqüência gastrite, metaplasia, carcinoma “*in situ*”, carcinoma invasivo apresenta considerável variação nos genes envolvidos.<sup>142</sup> As dificuldades para a compreensão das bases moleculares do câncer gástrico e a constatação do potencial apresentado para invasão vascular e formação precoce de metástases, estimulam a busca de outros mecanismos, como a angiogênese, como alvos potenciais para o tratamento dessa neoplasia.<sup>83</sup>

A angiogênese tumoral é fator reconhecido de mau prognóstico em várias neoplasias, no entanto existem várias controvérsias quanto a aspectos de sua quantificação e ao seu real valor prognóstico, especialmente quando considerada em conjunto com outros agentes já bem estabelecidos.<sup>144</sup> Ainda não existem estudos prospectivos que determinem o método de aferição mais adequado para evitar as variações na avaliação subjetiva por observadores diferentes. Dois consensos internacionais já foram publicados com a intenção de padronizar os métodos de quantificação da angiogênese.<sup>64,65</sup> A partir dos estudos de Weidner e colaboradores,<sup>66</sup> a avaliação da neovascularização tumoral tem sido quantificada por imunistoquímica utilizando-se marcadores endoteliais para marcação de microvasos, não evidenciados na avaliação histológica convencional. A contagem de microvasos por campo de

um tumor sólido fornece estimativa da rede vascular e pode ser mensurada para a verificação de progressão ou regressão tumorais na avaliação de drogas que combatam a angiogênese. O controle de qualidade na seleção do material, seu processamento, realização adequada da imunistoquímica, 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. Os anticorpos mais utilizados atualmente para a avaliação da DMV são o anti-CD31 e o anti-CD34. A escolha dos autores pelo anticorpo anti-CD34, neste estudo, deve-se à possibilidade de erros na avaliação com o anticorpo anti-CD31, que ocorrem quando áreas com infiltrados inflamatórios proeminentes são interpretadas erroneamente como “hot spots”.<sup>64,65</sup> Além disso, Bialas e colaboradores,<sup>145</sup> em estudo com 40 espécimes de carcinoma gástrico, relataram que na comparação entre os anticorpos anti-CD31, anti-CD34 e anti-fator de von Willebrand, as preparações com o CD34 foram as mais fáceis de avaliar e mostraram melhor relação com a angiogênese.

A escolha pela análise digital<sup>73</sup> das imagens neste estudo justifica-se pela tentativa de diminuir as dificuldades metodológicas na aferição da densidade microvascular, as quais podem resultar em variações de resultados quando interpretadas por observadores diferentes. A capacidade do programa utilizado de capturar as imagens do microscópio pelo computador permite o armazenamento, a contagem dos vasos e a discussão sobre a avaliação da angiogênese com imagens padronizadas e com a aplicação de grades de demarcação que facilitam e retiram fatores subjetivos da avaliação. O único elemento não-objetivo que permanece na apreciação é a seleção das áreas mais vascularizadas (*hot spots*).

O processo de angiogênese tumoral é evento importante no desenvolvimento de várias neoplasias, inclusive no estômago, porém pouco se sabe dos mediadores regulatórios da angiogênese no adenocarcinoma gástrico. A molécula mais estudada até o momento, o VEGF, apresenta resultados contraditórios como fator prognóstico desta moléstia.<sup>74-80</sup> A avaliação da



DMV no câncer gástrico tem mostrado correlação com o prognóstico em trabalhos realizados por grupos japoneses.<sup>146</sup> Maeda e colaboradores<sup>147</sup> relataram que pacientes com maior DMV apresentavam pior prognóstico, sendo essa contagem fator prognóstico independente na análise multivariada da sobrevida. Tanigawa e colegas,<sup>148</sup> em estudo com 107 pacientes, mostraram que a expressão do anticorpo anti-CD34 não mostrou relação com comprometimento ganglionar, todavia foi significativamente maior nos pacientes que apresentaram metástases hematogênicas, concluindo que a avaliação da vascularização tumoral possa ser utilizada para identificar pacientes que se beneficiariam com tratamento adjuvante. Já no trabalho do grupo de Xiangming,<sup>149</sup> a avaliação da DMV foi útil para prever metástases linfonodais nos tumores precoces. Takahashi e colaboradores<sup>150</sup> demonstraram que a angiogênese relacionou-se com a agressividade dos tumores do tipo intestinal, mas não houve relação nos carcinomas do tipo difuso. Apesar de trabalhos que empregam a DMV na avaliação do câncer gástrico não definirem um ponto de corte entre os pacientes com alta ou baixa vascularização tumoral, a média da DMV utilizada pela maioria dos autores foi cerca de 40 vasos por campo.<sup>148-151</sup> No único trabalho que avalia a DMV em pacientes com câncer gástrico realizado com pacientes no Brasil, de modo surpreendente, o número variou desde 36 até 256 vasos por campo, com média de 105 e mediana de 102.<sup>152</sup> No presente estudo, do ponto de vista estatístico, como a média do número de microvasos foi elevado em todos os pacientes, utilizou-se a mediana para separar dois grupos de tumores conforme a densidade microvascular. A partir desta divisão, a análise da densidade microvascular não esteve associada com alteração da sobrevida, tanto na análise univariada quanto na análise multivariada ajustada para o estadiamento tumoral, grau de diferenciação celular do tumor e para as classificações de Borrmann e Lauren. Tal achado pode ter explicação na escassez de tumores precoces encontrados em nossa amostra.

Couvelard e colaboradores,<sup>153</sup> em estudo avaliando a seqüência de progressão

neoplásica em esôfago de Barrett, demonstraram que a vascularização foi mais pronunciada em estágios iniciais do tumor e se correlacionou com melhor sobrevida. Quando foram excluídos os pacientes com tumores precoces (cerca de 30% dos pacientes da amostra), a densidade microvascular, contudo, não apresentou valor prognóstico. A conclusão dos autores foi de que as propriedades angiogênicas ocorrem precocemente no desenvolvimento do adenocarcinoma originado do esôfago de Barrett. Deve ser considerada a hipótese de que nos estágios mais avançados do câncer, fatores prognósticos estabelecidos (grau de invasão na parede gástrica, metástases linfonodais e presença de metástases a distância) sejam mais importantes na determinação do prognóstico. Quando da avaliação concentrada nos pacientes com câncer gástrico precoce, Maehara e colaboradores<sup>154</sup> conseguiram determinar dois grupos com comportamento biológico e sobrevida diferentes. Foi demonstrado que o VEGF induziu angiogênese tumoral, invasão vascular e metástases hematogênicas no grupo com pior prognóstico. Os autores discutem inclusive o emprego de drogas antiangiogênicas no grupo com pior prognóstico para evitar as recidivas e melhorar a sobrevida. A possibilidade de que a angiogênese seja evento importante nos estágios iniciais do tumor pode justificar a falta de correlação entre a densidade microvascular e o prognóstico dos pacientes do presente estudo, o qual é formado predominantemente por tumores avançados.

A busca de outras moléculas envolvidas no processo da angiogênese pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela regulação da formação de novos vasos no câncer gástrico. O FT tem sido bastante pesquisado em outros tipos de câncer, porém a revisão da literatura mostrou carência de estudos relevantes na associação com o câncer gástrico, motivo pelo qual optou-se pela realização desta pesquisa.

Estudos mostram que a deficiência do fator tecidual em ratos transgênicos causa morte do embrião devido a desenvolvimento vascular anormal.<sup>112</sup> Lesões histopatológicas semelhantes ocorrem em embriões com deficiência de VEGF,<sup>113</sup> sugerindo que o FT e o

VEGF possam regular funções similares. A expressão do fator tecidual, além de iniciar o processo da via extrínseca da coagulação, está relacionada a maior agressividade e a pior prognóstico em uma série de tumores humanos.<sup>100-102,118,120</sup> O conhecimento dos mecanismos ocorrentes nos fenômenos que envolvem a coagulação e o câncer permite a compreensão atual da relação entre esses dois complexos sistemas.<sup>155</sup> O fator tecidual produzido pelas neoplasias malignas parece participar do desenvolvimento do câncer por mecanismos não só relacionados à formação de coágulos, mas também através de um sistema de sinalização intracelular independente de elementos da coagulação sanguínea.<sup>110,111,155</sup>

Callander e colaboradores,<sup>156</sup> analisando diversas linhagens de tumores sólidos diferentes, demonstraram a expressão do FT em 41 de 60 casos das neoplasias de origem epitelial. Nas lesões do trato gastrointestinal, altos índices de positividade para o FT foram encontrados. Todos os casos de carcinoma de pâncreas e de estômago avaliados apresentavam expressão positiva para o FT.

Por meio de análise imunoistoquímica, o presente estudo mostrou que o fator tecidual foi expresso pelas células tumorais do adenocarcinoma gástrico em todos os 50 pacientes. Essa alta expressão sugere a possibilidade de que o emprego de drogas específicas para seu bloqueio possam ser alternativas tentadas no tratamento desse tumor. Apesar do predomínio dos casos com alta intensidade de expressão, foi possível a divisão dos pacientes em dois grupos, com o objetivo de comparar a intensidade da expressão com fatores prognósticos e com a sobrevida. Ao contrário do resultado demonstrado em neoplasias de pulmão,<sup>100</sup> de próstata,<sup>157</sup> de fígado<sup>116</sup> e de cólon,<sup>158</sup> não houve relação entre a intensidade da expressão do FT e a densidade microvascular.

A literatura revisada até maio de 2006 apresentou apenas um artigo, escrito em chinês, correlacionando a expressão do fator tecidual, a angiogênese e o significado clínico em pacientes com câncer gástrico.<sup>123</sup> Mesmo que sua metodologia não seja a mesma, os

resultados do estudo chinês foram diferentes dos encontrados em nossa pesquisa. Chama a atenção que apenas 65% dos espécimes tumorais expressaram imunorreatividade para o fator tecidual, e o número médio de microvasos por campo foi menor ( $36,14 \pm 9,94$ ). Apesar de os estágios T e N serem semelhantes nos dois estudos, 40% dos pacientes no estudo chinês apresentaram metástases hepáticas. A expressão do FT foi fator significativo para o comprometimento metastático do fígado e para estágios avançados do tumor. A sobrevida foi significativamente maior nos pacientes que não expressavam o FT.

A análise do presente estudo mostrou resultados surpreendentes. Quando comparados os principais fatores prognósticos do adenocarcinoma gástrico com a expressão do FT (tabela 5), nota-se que, apesar de não ser identificada relevância estatística nas diferenças, o grupo com baixa intensidade do FT apresentou, com exceção da classificação Borrmann, perfil desfavorável nos elementos associados com pior prognóstico. Esse conjunto de fatores pode explicar o resultado da análise da curva de sobrevida (figura 10) que mostra de maneira muito significativa pior sobrevida para os pacientes com baixa intensidade de expressão do FT. A análise multivariada, na qual são ajustados esses potenciais fatores de confusão, mostrou que nem a expressão intensa do FT, nem a densidade microvascular possuíram poder suficiente para isoladamente influenciar no prognóstico dos pacientes.

Infelizmente, a dificuldade local do diagnóstico precoce dessa neoplasia prejudica a avaliação dos dados. O aumento no número de pacientes da amostra, principalmente com tumores em fases iniciais, certamente contribuiria para definir melhor a relação do estágio do tumor e a intensidade da expressão do FT.

Uma das explicações para resultados divergentes na expressão do FT em variados estudos pode ser a existência de linhagens diferentes de células gástricas tumorais. Zhang e colaboradores<sup>124</sup> demonstraram que, de quatro linhagens celulares diferentes de adenocarcinoma gástrico, apenas uma, a linhagem SGC-7901, estava associada à produção de

FT e VEGF. Os tumores sólidos originados dessa linhagem apresentavam neoplasias caracterizadas por intensa vascularização que, quando manipulados com deleções específicas para o FT, transformavam-se em tumores com baixo número de vasos. Tais dados reforçam teorias cada vez mais consistentes de que os resultados díspares em termos de cura do câncer gástrico no Japão, quando em comparação com os do mundo ocidental, podem originar-se de diferenças no diagnóstico<sup>159</sup> e na própria estrutura do tumor.<sup>160</sup>

Elucidar “*como*” e “*em quais circunstâncias*” o fator tecidual exerce suas funções, ativa seus mecanismos de ação e dimensiona as propriedades que se relacionam com o processo de coagulação normal fazem-se necessários. Esses estudos poderão revelar as propriedades que contribuem para a progressão do câncer e identificar substâncias com poder de inibição seletiva de tais funções, a fim de que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas.

O presente estudo enquadra-se em linha 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 a angiogênese e marcadores tumorais em espécimes de neoplasias de cabeça e pescoço, de próstata, de cólon, de bexiga e de estômago. Especula-se que, confirmando sua importância na gênese desses tumores, o fator tecidual possa ser estudado como marcador sérico e urinário nos pacientes com essas neoplasias. Os trabalhos iniciais objetivam lançar as bases para tais pesquisas. Neste sentido, o presente estudo pode apresentar contribuição para a compreensão dos mecanismos de angiogênese tumoral no adenocarcinoma gástrico. Novos estudos, utilizando como parâmetro para avaliação da formação de vasos outros fatores, tais como o VEGF e o CD-31, estão sendo conduzidos para determinar com mais precisão os graus de angiogênese nesses tumores. O desenvolvimento de recursos técnicos que possibilitem métodos para avaliação quantitativa da expressão do fator tecidual também estão sendo estudados. A maior

perspectiva sugerida por este estudo, talvez seja a possibilidade de empregar drogas específicas para o bloqueio do FT como alternativa para o tratamento do adenocarcinoma gástrico, uma vez que o mesmo encontra-se superexpresso nesse tumor.

## 7. CONCLUSÕES

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

1- Ocorreu expressão do fator tecidual nas células tumorais de todos os pacientes, com intensidade da expressão considerada alta em 78% dos espécimes.

2- Não houve correlação entre a intensidade da expressão do fator tecidual e o grau de angiogênese tumoral.

3- Não houve correlação entre a intensidade da expressão do fator tecidual e a densidade microvascular e os fatores prognósticos conhecidos para o adenocarcinoma gástrico. Também não houve correlação com a sobrevida dos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica dessa neoplasia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001; 37 Suppl 8:S4-66.
2. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Eng J Med*. 1995; 333 (1):32-41.
3. Fingerhut A, Hay JM, Millat B, Lacaine F, Fagniez PL. General and gastrointestinal tract surgery in France. *Arch Surg*. 1998; 133:568-74.
4. Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Eisner MP, Horner MJ, Howlader N, Hayat M, Hankey BF, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review. 1975-2003*. National Cancer Institute. Bethesda, 2005.
5. Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2006. Capturado da Internet em 30/04/2006. Disponível em [http:// www.inca.org.br](http://www.inca.org.br).
6. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1998. Rio de Janeiro. Pro-Onco/INCA,1998.
7. Lourenço GL, Hamada GS. Gastric cancer in Brazil. *Gastric Cancer*. 2001;4:103-5.



8. Curi Hallal AL, Gotlieb SL, Latorre MR. Evolução da mortalidade por neoplasias malignas no Rio Grande do Sul, 1979-1995. *Rev Bras Epidemiol.* 2001; 168(3): 168-77.
9. Bowles MJ, Benjamin IS. ABC of the upper gastrointestinal tract: cancer of the stomach and pancreas. *BMJ.* 2001;323:1413-6.
10. El-Kadre LJ, Rodrigues FCM, Malheiros CA, Rahal F. Carcinoma gástrico em pacientes com menos de 40 anos de idade. *Rev Col Bras Cir.* 1995;22:117-19.
11. Siewert JR, Fink U, Sendler A, Becker K, Bottcher K, Feldmann HJ, et al. Gastric cancer. *Curr Probl Surg.* 1997;34:835-942.
12. Gore R. Gastrointestinal cancer. *Radiol Clin North Am.* 1997;35:295–310.
13. Antonioli DA. Precursors of gastric carcinoma: A critical review with a brief description of early (curable) gastric carcinoma. *Hum Pathol.* 1994;25:994-1005.
14. Adam YG, Efron G. Trends and controversies in the management of carcinoma of the stomach. *SGO.* 1989;169:371-85.
15. Ramon JM, Serra L, Cerdo C, Oromi J. Dietary factors and gastric cancer risk. A case– control study in Spain. *Cancer.* 1993;71:1731–1735.

16. Huang XE, Tajima K, Hamajima N, Kodera Y, Yamamura Y, Xiang J, et al. Effects of dietary, drinking, and smoking habits on the prognosis of gastric cancer. *Nutr Cancer*. 2000;38(1):30-6.
17. Franceschi S, La Vecchia C. Alcohol and the risk of cancer of the stomach and colon-rectum. *Dig Dis*. 1994;12:276-89.
18. Devesa S, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer*. 1998;83(10):2049-53.
19. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, et al. Gastric precancerous process in a high risk population: Cross sectional studies. *Cancer Res*. 1990;50:6735-40.
20. Lemos Jr A, Vivi AA, Lourenço Filho DD, Almeida JL, Chaib AS. Carcinoma do coto gástrico. *Rev Col Bras Cir*. 1993;20:31-33.
21. McCulloch P. Gastric cancer. *Postgrad Med J*. 1996;72:450-57.
22. Bruckestein AH. Gastric carcinoma – Battling a stalwart enemy. *Postgrad Med J*. 1989;85:235-38.
23. Cutait R, Garicochea B, Cotti G. Diagnóstico e manejo do câncer gástrico familiar. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2001;28:288-292.

24. Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. New concepts of molecular biology on gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology*. 2005;52(64):1305-12.
25. Toneto MG. Gastrectomia para o tratamento do adenocarcinoma gástrico: Análise dos fatores que influenciam os resultados pós-operatórios em pacientes idosos [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da PUCRS; 1999.
26. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg*. 2005; 241(1):27-39.
27. Sadowski DC, Rabeneck L. Gastric ulcers at endoscopy: brush, biopsy, or both? *Am J Gastroenterol*. 1997;92(4):608-13.
28. Volpe CM, Koo J, Miloro SM, Driscoll D, Nava HR, Douglass HO. The effect of extended lymphadenectomy on survival in patients with gastric carcinoma. *J Am Coll Surg*. 1995;181:56-64.
29. Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, et al. Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. *Cancer*. 1992; 70: 1030-7.
30. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg*. 1993;218:583-92.

31. Correa P, Piazuolo MB, Camargo MC. The future of gastric cancer prevention. *Gastric Cancer*. 2004;7:9-16.
32. Bresciani CJC, Gama-Rodrigues JJ, Strassmann V, Waitzberg DL, Matsuda M, Pinotti HW. Tratamento adjuvante do câncer gástrico avançado após ressecção radical: Resultados da associação 5-fluorouracil, adriamicina e mitomicina-C – 5 anos de seguimento. *Rev Col Bras Cir*. 1997;24:219-25.
33. Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GNJ. Time trends in gastric carcinoma: Changing patterns of type and location. *Am J Gastroenterol*. 1992; 87: 572-79.
34. Hohenberger P, Hunebein M. Detection and management of advanced gastric cancer. *Ann Oncology*. 1996;7:197-203.
35. AJCC Cancer Staging Manual, 6<sup>a</sup> Ed, 2002. Capturado da Internet em 30/04/2006. Disponível em <http://www.cancerstaging.org>.
36. Bringaze WL, Chappuis CW, Cohn I, Correa P. Early gastric cancer – 21- year experience. *Ann Surg*. 1986;204:103-7.
37. Soetikno R, Kaltenbach T, Yeh R, Gotoda T. Endoscopic mucosal resection for early cancers of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Oncol*. 2005; Jul 10;23 (20):4490-8.

38. Hiki Y, Sakakibara Y, Mieno H, Shimao H, Kobayashi N, Katada N. Endoscopic treatment of gastric cancer. *Surg Endosc.* 1991;5:11-3.
39. Hermaneck P. pTNM and residual tumor classifications: Problems of assessment and prognostic significance. *World J Surg.* 1995; 19:184-90.
40. Kuntz C, Herfarth C. Imaging diagnosis for staging of gastric cancer. *Semin Surg Oncol.* 1999 Sep;17(2):96-102.
41. Karpeh MS Jr, Brennan MF. Gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 1998 ;5(7):650-6.
42. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *Br J Surg.* 1997;84:1651-64.
43. Chun YS, Lindor NM, Smyrk TC, Petersen BT, Burgart LJ, Guilford PJ, Donohue JH. Germline E-cadherin gene mutations. Is prophylactic total gastrectomy indicated? *Cancer.* 2001;92:181-7.
44. Rutledge RH. Theodor Billroth: A century later. *Surgery.* 1995;118:36-43.
45. Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H. Optimum resection with lymph node dissection for gastric cancer. In: Harold Wanebo, Ed. *Surgery for gastrointestinal cancer: A multidisciplinary approach.* Lippincot-Raven; 1997. p.319-27,.

46. The Society for Surgery of the Alimentary Tract (SSAT) - Patient Care Guidelines. Surgical Treatment of Gastric Cancer. Capturado da Internet em 18/04/2006. Disponível em <http://www.ssat.com/cgi-bin/guidelines>.
47. Saito A, Korenaga D, Sakagushi Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Surgical treatment for gastric carcinoma with concomitant hepatic metastasis. *Hepato-gastroenterology*. 1996;43:560-64.
48. McCulloch P. Should general surgeons treat gastric carcinoma? An audit of practice and results, 1980-1985. *Br J Surg*. 1994;81:417-20.
49. Ajani JA, Mansfield PF, Lynch PM, Pisters PW, Feig B, Dumas P, et al. Enhanced staging and all chemotherapy preoperatively in patients with potentially resectable gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2403-11.
50. Songun I, Keizer HJ, Hermans J, Klementsich P, de Vries JE, Wils JA, et al. Chemotherapy for operable gastric cancer: Results of the Dutch randomized FAMTX trial. The Dutch Gastric Cancer Group (DGCG). *Eur J Cancer*. 1999; 35:558-62.
51. Earle CC, Maroun JA. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomized trials. *Eur J Cancer*. 1999 Jul;35(7):1059-64.
52. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for

adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med.* 2001 Sep 6; 345 (10) :725-30.

53. Hundahl SA, Macdonald JS, Benedetti J, Fitzsimmons T; Southwest Oncology Group and the Gastric Intergroup. Surgical treatment variation in a prospective, randomized trial of chemoradiotherapy in gastric cancer: the effect of undertreatment. *Ann Surg Oncol.* 2002 Apr;9(3):278-86.
54. Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H, Bonenkamp JJ, Kranenbarg K, Songun I, et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol.* 2004;22(11):2069-77.
55. McCulloch P, Niita ME, Kazi H, Gama-Rodrigues JJ. Gastrectomy with extended lymphadenectomy for primary treatment of gastric cancer. *Br J Surg.* 2005;92(1):5-13.
56. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Eur J Cancer.* 1996; 32(14): 1501-5.
57. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
58. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

59. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 1;61(3):253-70.
60. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992; 359 (6398): 843-5.
61. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med.* 1996 Jun;2(6):689-92.
62. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;37(2):97-114.
63. Heymach JV. Angiogenesis and antiangiogenic approaches to sarcomas. *Curr Opin Oncol.* 2001;13(4):261-9.
64. 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; 32A:2474-2484 .
65. 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 tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38: 1564–1579.



66. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3;324(1):1-8.
67. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 1992; 340(8812):145-6.
68. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 1993; 143(2):401-9.
69. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanomas. *Am J Pathol.* 1994;145(3):510-4.
70. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity; purification of a tumor derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 1984; 223: 1296-99.
71. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029-1039.
72. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr Opin Oncol.* 1998 Nov;10(6):560-5.

73. Tarta C, Silva VD, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Chiele Neto C, Tanaka S . Digital image analysis and stereology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004 Aug;26(4):201-6.
74. Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang S, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *Cancer.* 1996;77:858-63.
75. Erenoglu C, Akin ML, Uluutku H, Tezcan L, Yildirim S, Batkin A. Angiogenesis predicts poor prognosis in gastric carcinoma. *Dig Surg.* 2000;17(6):581-586.
76. Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(7):1604-6.
77. Ichinoe M, Mikami T, Shiraishi H, Okayasu I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. *Histopathology.* 2004; 45(6):612-8.
78. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 1997 Feb;15(2):826-32.

79. Ikeguchi M, Oka S, Saito H, Kondo A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. The expression of vascular endothelial growth factor and proliferative activity of cancer cells in gastric cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 1999;384:264–270.
80. Kido S, Kitadai Y, Hattori N, Haruma K, Kido T, Ohta M, et al. Interleukin 8 and vascular endothelial growth factor—prognostic factors in human gastric carcinomas? *Eur J Cancer.* 2001;37:1482–1487.
81. Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Yanoma S, Noguchi Y. Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma. *Cancer Lett.* 2000;153:7–12.
82. Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 2000;20:4489–4493.
83. Kakeji Y, Maehara Y, Sumiyoshi Y, Oda S, Emi Y. Angiogenesis as a target for gastric cancer. *Surgery.* 2002;131:S48-54.
84. Dunn PM. Professor Armand Trousseau (1801–67) and the treatment of rickets. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;80:F155–F157.
85. Prandoni P, Lensing AW, Buller HR. Deep vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1128-33.

86. Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol.* 2001; 106: 6-12.
87. Sorensen HT, Mellemkjær L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2000; Dec 21;343(25):1846-50.
88. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ Jr, Forcier RJ, et al. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer.* 1984; 53 (10):2046-52.
89. Carmeliet P, Collen D. Molecules in focus: tissue factor. *Int J Biochem & Cell Biol.* 1998; 30: 661-7.
90. Banner DW. The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost.* 1997; 78(1):512-5.
91. Higashi S, Iwanaga S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol.* 1998; 67(3):229-41.
92. Osterud B. Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost.* 1997; Jul 78 (1):755-8.

93. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Van Vlaenderen P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development *Nature*. 1996; 383: 73-5.
94. Diehl JL, Borgel D. Sepsis and coagulation. *Curr Opin Crit Care*. 2005;11(5):454-60.
95. Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet*. 1997 Mar 15;349(9054):769-71.
96. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin and cancer. *Chest*. 2003; 124:58S-68S.
97. 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(2): 145-50.
98. 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(21): 5063-70.

99. Ueda C, Hirohata Y, Kihara Y, Nakamura H, Abe S, Akahane K, et al. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol*. 2001; 36(12): 848–50.
100. 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(1):19–22.
101. 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(9): 1877–83.
102. Abdulkadir SA, 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(4): 443–7.
103. 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(2): 295–301.
104. Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res*. 2001; 102(6): V215–24.
105. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9(5): 401–6.

106. Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S, Andrassy M, Chen B, Stern DM, et al. Tissue factor—a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001; 86(1):334–45.
107. Nash GF, Walsh DC, Kakkar AK. The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. *Lancet Oncol.* 2001; 2(10): 608–13.
108. 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.
109. Ollivier V, Chabbat 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(5): 1374–81.
110. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 2004; 30(1):31-44.
111. Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost.* 2004; 30(1):21-30.

112. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*. 1996; 88:1583–1587.
113. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380:439–442.
114. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldher R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 1994; 94:1320–1327.
115. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol*. 2002; 69(4): 247–54.
116. 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 Nov 1;9(14):5339-45.
117. Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol*. 2004;5(11):655-63.



118. Kakkar AK, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Lemoine NR, Williamson RC. A characterization of the coagulant and fibrinolytic profile of human pancreatic carcinoma cells. *Haemostasis*. 1998; 28: 1-6.
119. Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*. 2003; 62(6):1078-82.
120. 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.
121. Wang X, Wang E, Kavanagh JJ, Freedman RS. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med*. 2005; 21:3-25.
122. Chinen K, Kazumoto T, Ocurra Y, Matsubara O, Tsuchiya E. Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy caused by a gastric carcinoma expressing vascular endothelial growth factor and tissue factor. *Pathology International*. 2005;55:27–31.
123. Jiao ZY, Gou CZ, Cao N, Li YN. Correlation of tissue factor expression to angiogenesis of gastric carcinoma and its clinical significance. *Chin J Cancer*. 2005; 24 (7): 880-4.
124. Zhang J, Ding J, Zhang X, Shao X, Hao 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 Jul;4(7):769-72.

125. Hu Z, Sun Y, Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:8161–8166.
126. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res*. 2001; 61:711–716.
127. Belting M, Dorrel M, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med*. 2004; 10:502-9.
128. Kondo K, Yokoyama I, Kikuchi M, Akiyama S, Ito K, Takagi H. Early gastric carcinoma after gastrojejunostomy: clinical and pathological aspects. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:2213-15.
129. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: na attempt at a histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
130. Wanke M, Schwan H. Pathology of gastric cancer. *World J Surg*. 1979;3:675.

131. 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*. 1988;96(5):379-94.
132. Toneto MG, Moreira LF, Jeckel Neto E, Souza HP. Gastrectomia em pacientes idosos – análise dos fatores relacionados a complicações e mortalidade. *Rev Col Bras Cir*. 2004; 31(6): 373-379.
133. Kim TH, Han SU, Cho YK, et al. Perigastric lymph node status can be a simple prognostic parameter in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000; 47:1475–1478.
134. Longmire JR WP. A current view of gastric cancer in the US. *Ann Surg*. 1993; 218(5):579-83.
135. Hundahl SA, Menck HR, Mansour EG, Winchester DP. The National cancer data base report on gastric carcinoma. *Cancer*. 1997;80:2333-41.
136. Bevilaqua RG, Alcântara PS, Zanvettor PH, Pollara WM, Soares LA. Fatores prognósticos das complicações pós-operatórias nas ressecções por câncer gástrico. *Rev Col Bras Cir*. 1996;23:51-56.
137. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder J. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg*. 1998;228:449–461.

138. Adachi Y, Shiraishi N, Suematsu T, Shiromizu A, Yamaguchi K, Kitano S. Most important lymph node information in gastric cancer: multivariate prognostic study. *Ann Surg Oncol.* 2000;7:503–507.
139. Howson, CP, Hiyama T, Wynder E. The decline of gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiologic Review.* 1986;8:1-27.
140. Abib AR, Oliveira IM, Koifman S. *Cad. Saúde Públ. Rio de Janeiro.* 1997; 13(Supl 1):99-104.
141. Marigo C, Okuyama M, Santo GC. *Cad. Saúde Públ Rio de Janeiro.* 1997; 13(Supl 1):93-97.
142. Boussioutas A, Taupin D. Towards a molecular approach to gastric cancer management. *Intern Med J.* 2001;31:296 –303.
143. Lee S, Baek M, Yang H, Bang Y, Kim WH, Ha JH, et al. Identification of genes differentially expressed between gastric cancers and normal gastric mucosa with cDNA microarrays. *Cancer Lett.* 2002;184:197-206.
144. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 505-15.

145. Bialas M, Okon K, Czopek J. Assessing microvessel density in gastric carcinoma: a comparison of three markers. *Pol J Pathol.* 2003;54(4):249-52.
146. Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Mabuchi H, Hara H, Sako S, et al. Prognostic value of tumor cell proliferation and intratumor microvessel density in advanced gastric cancer treated with curative surgery. *Int J Oncol.* 1998;13:255–259.
147. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 1995;13:477–481.
148. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Iki M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:2671–2676.
149. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, et al. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 1998;5:585–589.
150. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1679–1684.

151. Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res.* 2001;7(2):129-34.
152. Lourenço LG, Rigueiro MP, Moreira FT, Herbella F, Castelo A, Del Grande JC, et al. Angiogenesis and prognosis in gastric adenocarcinoma. *Revista Mexicana de Coloproctología.* 2005;Vol. 11:33-37.
153. Couvelard A, Paraf F, Gratio V, Scoazec JY, Henin D, Degott C, Flejou J. Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol.* 2000; 192: 14-8.
154. Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Baba H, Sugimachi K. Tumor growth patterns and biological characteristics of early gastric carcinoma. *Oncology.* 2001;61(2):102-12.
155. Shoji M, Hancock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, et al. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer. Immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol.* 1998; 152 (2): 399-411
156. Callander NS, Varki N, Rao VM. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer.* 1992; 70: 1194-1201.

157. Carvalhal GF. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator tecidual no câncer de próstata de humanos: correlação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.
  
158. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz J, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005;105:1734-1741.
  
159. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Ridelli RH, Shimoda T, et al. Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and Western pathologists. *Lancet*. 1997;349:1725-29.
  
160. Bollschweiler E, Boettcher K, Hoelscher AH, Sasako M, Kinoshita T, Maruyama K, Siewert JR. Is the prognosis for Japanese and German patients with gastric cancer really different? *Cancer*. 1993;71:2918-25.

## **9. ANEXOS**

**Cartas de confirmação da aprovação de dois trabalhos enviados para o “XXVI Congress of the International Academy of Pathology”, a ser realizado em Montreal, Canadá, de 16 a 21 de setembro de 2006.**



Dear Vinicius Duval Da Silva,

We are pleased to confirm that your abstract #2110, title: IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TISSUE FACTOR EXPRESSION IN HUMAN GASTRIC CARCINOMA: CORRELATION WITH ANGIOGENESIS, CLINICOPATHOLOGICAL ASPECTS AND SURVIVAL., has been accepted for presentation as a poster at the XXVI Congress of the International Academy of Pathology, taking place September 16-21, 2006 in Montreal.

SCHEDULE: The date and time of your poster session will be confirmed in June. Instructions for preparation and installation of your poster will be included at that time.

PUBLICATION: Your abstract will be published online and in the Abstract Book, to be distributed to registered delegates on site in Montreal. Abstracts will also be posted online in early July at the USCAP site ([www.uscap.org](http://www.uscap.org)). (See Registration below.)

REGISTRATION: Paid registration is required no later than June 15, 2006. (See 'Registration' page on our site [www.iap2006.com](http://www.iap2006.com).) If you are not registered and paid by this date, your abstract will not be included in the Abstract Book nor posted on the USCAP website.

We look forward to your participation in the centennial congress of the Academy.

Yours truly,

IAP 2006 Congress Secretariat - JPdL for  
Dr Richard Zarbo, Chair of Poster/Abstract Committee

[info@iap2006.com](mailto:info@iap2006.com)  
[www.iap2006.com](http://www.iap2006.com)

XXVI Congress of the International Academy of Pathology  
IAP 2006 Congress Secretariat - JPdL  
1555 Peel, Suite 500, Montréal, QC, H3A 3L8, Canada

ES-REF#:1231:60:2110

## ABSTRACT SUBMISSIONS FOR IAP 100TH ANNIVERSARY CONFERENCE

AUTHORS		
NAME	ORGANIZATION	TYPE
Vinicius Duval Da Silva	PUCRS	Both
Marcelo G Toneto	PUCRS	Author
Gustavo F Carvalho	PUCRS	Author
Hamilton P De Souza	PUCRS	Author
Lucio S Fillmann	PUCRS	Author
Carlos L Reichel	PUCRS	Author
Franciel Linne	PUCRS	Author
ABSTRACT CONTENT		
<b>Title (in CAPS):</b>	IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TISSUE FACTOR EXPRESSION IN HUMAN GASTRIC CARCINOMA: CORRELATION WITH ANGIOGENESIS, CLINICOPATHOLOGICAL ASPECTS AND SURVIVAL.	
<b>Abstract Text:</b>	<p>Background: Recent studies have shown that tissue factor (TF), a primary physiologic initiator of coagulation cascade, may be involved in tumor angiogenesis and metastasis. This study was designed to study whether TF expression correlates with microvessel density (MVD), clinical presentation, TNM and prognosis in human gastric carcinoma.</p> <p>Design: Tissue samples were obtained from 50 specimens of resected gastric carcinoma. Clinicopathologic and follow-up data of patients were prospectively collected. Expression of TF was examined by immunohistochemical methods. Tumor MVD was evaluated using anti-CD34 as the endothelial marker. Statistical analysis comparing the TF expression with MVD, TNM and overall survival was performed.</p> <p>Results: Forty-eight (96%) patients in this series were diagnosed as advanced gastric carcinoma. TF was expressed in all tumors, and in 43(86%) patients it was considered a high expression. However, the intensity of tissue factor expression was not associated with increased microvascular density, TNM stage or lesser survival in this study.</p> <p>Conclusion: This study shows that TF has a high expression in gastric carcinoma, but TF may be not useful as a prognostic marker. Research with anti-TF drugs may be an interesting target in the treatment this disease.</p>	
<b>Category:</b>	Gastrointestinal	

Dear Vinicius Duval Da Silva,

We are pleased to confirm that your abstract #2111, title: IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TISSUE FACTOR EXPRESSION IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA: CORRELATION WITH ANGIOGENESIS, CLINICOPATHOLOGICAL ASPECTS AND SURVIVAL., has been accepted for presentation as a poster at the XXVI Congress of the International Academy of Pathology, taking place September 16-21, 2006 in Montreal.

SCHEDULE: The date and time of your poster session will be confirmed in June. Instructions for preparation and installation of your poster will be included at that time.

PUBLICATION: Your abstract will be published online and in the Abstract Book, to be distributed to registered delegates on site in Montreal. Abstracts will also be posted online in early July at the USCAP site ([www.uscap.org](http://www.uscap.org)). (See Registration below.)

REGISTRATION: Paid registration is required no later than June 15, 2006. (See 'Registration' page on our site [www.iap2006.com](http://www.iap2006.com).) If you are not registered and paid by this date, your abstract will not be included in the Abstract Book nor posted on the USCAP website.

We look forward to your participation in the centennial congress of the Academy.

Yours truly,

IAP 2006 Congress Secretariat - JPdL for  
Dr Richard Zarbo, Chair of Poster/Abstract Committee

[info@iap2006.com](mailto:info@iap2006.com)  
[www.iap2006.com](http://www.iap2006.com)

XXVI Congress of the International Academy of Pathology  
IAP 2006 Congress Secretariat - JPdL  
1555 Peel, Suite 500, Montréal, QC, H3A 3L8, Canada

ES-REF#:1231:60:2111

## ABSTRACT SUBMISSIONS FOR IAP 100TH ANNIVERSARY CONFERENCE

AUTHORS		
NAME	ORGANIZATION	TYPE
Vinicius Duval Da Silva	PUCRS	Both
Lucio S Fillmann	PUCRS	Author
Gustavo F Carvalho	PUCRS	Author
Henrique Fillmann	PUCRS	Author
Erico Fillmann	PUCRS	Author
Marcelo G Toneto	PUCRS	Author
Hamilton P De Souza	PUCRS	Author
Roberto G Tonietto	PUCRS	Author
ABSTRACT CONTENT		
<b>Title (in CAPS):</b>	IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TISSUE FACTOR EXPRESSION IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA: CORRELATION WITH ANGIOGENESIS, CLINICOPATHOLOGICAL ASPECTS AND SURVIVAL.	
<b>Abstract Text:</b>	<p>Background: It is recognized that there is a potential interaction between malignant cell growth and the coagulation pathway. Recently, some studies suggested that tissue factor, a primary initiator of coagulation, is expressed in a variety of solid tumors in association with increased angiogenesis.</p> <p>Design: The immunohistochemical expression of tissue factor and microvascular density (CD34) of 43 colorectal carcinomas treated by surgery at HSL-PUCRS, were compared to TNM stage, gender and age of the patients.</p> <p>Results: An intensity of tissue factor expression ranging from 50 to 100% of tumor glands was observed in 88.3% of the tumors (38 patients) and was associated with an increased microvascular density (<math>28.4 \pm 10.1/0.66 \text{ mm}^2</math>). Patients with high expression of tissue factor had also a mean age of <math>60.2 \pm 11.5</math> years, whereas the five patients with lower activity of this protein (0 to 50% of tumor glands) were significantly younger (<math>42.6 \pm 10.2/0.66 \text{ mm}^2</math>) and presented microvascular densities of <math>17.1 (\pm 7.9)</math>. The intensity of tissue factor expression was not associated with TNM stage or survival in this study.</p> <p>Conclusion: High intensity of tissue factor expression in colorectal carcinoma appears to be related to microvessel density (<math>p &lt; 0.01</math>) and to be present in older patients (<math>p = 0.02</math>). Research of anti-tissue factor drugs may be an interesting target in the treatment this disease.</p>	
<b>Category:</b>	Gastrointestinal	