
JOÃO BATISTA MARCHESINI

ANGIOGÊNESE
E
CÂNCER DOS CÓLONS E
RETO

Correlação entre a intensidade da angiogênese tumoral, o estadiamento da neoplasia pela classificação de Dukes e a diferenciação histológica pela classificação de Broders

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Professor Doutor Marco Aurélio de Quadros Cravo
Co-orientadores:
Professor Doutor Osvaldo Malafaia
Professor Giovanni Loddo

Curitiba
1995

Dedicatória

*Dedico esta Tese a minha querida esposa,
sempre fiel e paciente companheira,
que abdicou do seu tempo comigo
para cedê-lo aos meus objetivos
universitários.*

*Dedico a ela, que nunca reclamou
minha presença ao seu lado. Muitas vêzes ficava, em
silêncio, observando-me
debruçado sobre os livros.*

*Dedico todo o respeito e admiração
a esta pequena “ grande ” mulher.*

Obrigado Elvirinha

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Osvaldo Malafaia, Digníssimo Coordenador do Curso de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, sempre amigo e companheiro, que muito me incentivou e me prestigiou, como coordenador deste curso e como meu co-orientador, a fim de que pudesse alcançar o presente objetivo.

Ao estimado amigo Professor Doutor Marco Aurélio de Quadros Cravo, que sugeriu o tema para esta Tese e, como meu orientador, brilhantemente me mostrou o caminho a seguir. Cumpriu seu papel de forma exemplar e invejável, pois ficou lado a lado em todas as horas, me ensinando e conferindo o meu trabalho.

Ao estimado Professor Giovanni Loddo, experiente mestre em imunohistoquímica, amigo que me ajudou a alcançar as metas que me propus..

Agradeço ao Professor Doutor Sérgio Brenner pelo aconselhamento inicial quando esboçávamos esta monografia. Suas palavras de estímulo foram preciosas.

Ao distinto e dileto amigo Professor Doutor Júlio Coelho, pelo seu exemplo de vida e invejável modelo a seguir.

Agradeço ao Sr. Marcos Cesar Alves, técnico em imunohistoquímica pelo preparo do material deste estudo.

Agradeço ao Professor Paulo Ricardo Bittencourt Guimarães, Professor Assistente do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná pelos cálculos estatísticos executados na presente monografia.

Ao Professor Ary Sabbag Junior, Professor Assistente do Departamento de Estatística da Unversidade Federal do Paraná, pelas

orientações, escolha do método estatístico e pela acolhida que me deu quando lhe solicitei apoio.

Aos estimados, jovens amigos, Marcelo e Maurício Malafaia, “experts” em diagramação de Teses e Dissertações, que tão prontamente colocaram seus préstimos a mostra nesta monografia.

Ao IBEL - Instituto Brasileiro de Estudos Lingüísticos, na pessoa do Professor Carlos Sanches, que prestou o inestimável serviço de revisão da língua vernácula.

“The last but not the least”

Agradeço a minha querida esposa, aos nossos filhos e netos que são importantes motivos para os quais sempre sonhei em legar um exemplo.

Sumário

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Angiogênese	2
1.2 Objetivos	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 Material	7
2.2 Métodos	7
2.2.1 Coloração por imunohistoquímica	8
2.2.2 Exame microscópico	9
2.2.3 Registros	10
2.2.4 Avaliação estatística	11
3. RESULTADOS	14
3.1 Os números absolutos	15
3.2 Resultado do tratamento estatístico	17
4. DISCUSSÃO	19
4.1 A angiogênese	20
4.2 Classificações, estadiamento e prognóstico	26
4.3 A imunohistoquímica e as colorações	31
4.4 A quantificação da angiogênese	32
4.5 Sobre os resultados obtidos.	38
5 TABELAS	41
6. ILUSTRAÇÕES	49
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. ANEXO - ESTATÍSTICA	65

Listas de tabelas

TABELA 1 - Métodos de avaliação prognóstica das neoplasias colo-retais	42
TABELA 2 - <i>Relação dos pacientes, segundo a média de vasos contados, gradação histológica, estadiamento tumoral, assim como características destes pacientes e as características da doença</i>	43
Tabela 3.1 - <i>Relação dos pacientes e os números de vasos que foram contados nos seus respectivos quadrantes dos campos microscópicos, a gradação histológica e o estadiamento tumoral</i>	44

Lista de Ilustrações

ILUSTRAÇÃO 1 - <i>Áreas coradas em marrom, indicando aglomerados de vasos sangüíneos, também denominados de "hotspots"</i>	50
ILUSTRAÇÃO 2 - <i>Um "hotspot" localizado num exame de pequeno aumento, agora visto com 100X e depois no aumento de trabalho de 200X</i>	51
ILUSTRAÇÃO 3 - <i>Células endoteliais isoladas, a partir das quais novos vasos serão formados</i>	52
ILUSTRAÇÃO 4 - <i>Vasos neoformados em meio de intenso infiltrado inflamatório crônico, linfoplasmocitário</i>	53
ILUSTRAÇÃO 5 - <i>Angiogênese intensa e anormal junto a um vaso sangüíneo mais calibroso</i>	54
ILUSTRAÇÃO 6 - <i>Tecido muscular adjacente a neoplasia, anormalmente rico em vasos sangüíneos neoformados quando comparado a ilustração 7..</i>	55
ILUSTRAÇÃO 7 - <i>Tecido muscular distante da neoplasia, normalmente pobre em vasos sangüíneos</i>	56

Resumo

A angiogênese é a capacidade de neoformação vascular de um determinado tecido. As neoplasias malignas dependem da angiogênese para o seu crescimento, invasão e formação de metástases. Este fenômeno é estimulado pelas células neoplásicas através de substância denominada Fator de Angiogênese Tumoral. Não é um fenômeno particular destas lesões. A angiogênese também ocorre de outras maneiras como em tecidos inflamatórios, em regeneração e em crescimento. O número exuberante de células endoteliais e vasos neoformados em certos tumores como os de mama, pulmão e próstata, entre outros, pode determinar a agressividade da lesão e seu prognóstico, assim como, o estabelecimento de terapêutica coadjuvante. Pesquisas sobre fatores anti-angiogênese tem sido feitas no sentido de ofertar novas perspectivas de tratamento para o câncer. No que diz respeito ao câncer colo-retal muito pouco tem sido publicado. A presente monografia tentou demonstrar se houve ou não correlação entre o número de células endoteliais e de vasos sangüíneos neoformados e o prognóstico da lesão quando usados os parâmetros da gradação de diferenciação tumoral, pela classificação de Broders e estadiamento tumoral, pela classificação de Dukes. As afirmativas publicadas na literatura médica quanto a utilidade da avaliação da angiogênese para o câncer de mama, pulmão e próstata não são aplicáveis ao câncer de cólons e reto. Não houve correlação entre a angiogênese tumoral, avaliada pela contagem de células endoteliais e vasos sangüíneos neoformados, a diferenciação tumoral, avaliada pela classificação de Broders e o estadiamento da lesão, utilizando-se a classificação de Dukes. Em neoplasias malignas, há indícios de que a víscera ôca tenha comportamento diferente dos órgãos sólidos quanto a neoformação vascular.

Abstract

Angiogenesis is the ability of vascular neoformation of a given tissue. Malignant neoplasms depend on the angiogenesis for their growth, invasion and metastasis formation. The neoplastic cells stimulate such phenomenon through a substance named Tumor Angiogenic Factor. Angiogenesis is not a particular phenomenon of malignant tumors. It occurs also in inflammatory tissues, as well as, during growing or tissue regeneration. The increased number of endothelial cells or newly formed blood vessels in malignant lesions such as in breast, lung or prostate maintains a strong correlation with the disease aggressiveness, prognosis and indication for adjuvant cancer treatment. Research on anti-angiogenic substances have been done to improve cancer therapy. Very little has been published about angiogenesis and colo-rectal cancer. The present study tried to establish eventual correlation among the number of endothelial cells and blood vessels in such neoplasms, tumor grading through Broders classification and tumor staging, using Dukes classification. The same statements, as far as angiogenesis is concerned, published in the medical literature, for breast, lung and prostate cancer are not applied for colo-rectal malignant neoplasms. It was not possible to establish a correlation among number of endothelial cells and blood vessels, tumor grading and pathological staging through Broders and Dukes classifications respectively. There is a possibility that the angiogenesis behaves differently in a hollow viscous when compared with solid organs.

INTRODUÇÃO

Capítulo 01

INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez na literatura médica em 1935 para definir o fenômeno da formação de novos vasos sanguíneos na placenta. (FOLKMAN ET AL 87)

Angiogênese tumoral refere-se ao crescimento de novos vasos no sítio de desenvolvimento da neoplasia e mesmo dentro do próprio tumor. (BACCHI 95)

Esta neovascularização tumoral é desencadeada e mantida por fatores secretados pelas próprias células neoplásicas e/ou células inflamatórias em resposta ao tumor. (BACCHI 95)

Por duas décadas, houve desacordo quanto aos conceitos relativos à vascularização dos tumores. As opiniões se dividiam entre os que acreditavam que os vasos já existissem previamente no tecido neoplásico e os que pensavam tratar-se de vasos neoformados. Os partidários da neoformação vascular discutiam se os vasos provinham de um estímulo oriundo das células neoplásicas, se advinham de um processo inflamatório concomitante ou se eram formados pelas próprias células neoplásicas que se ordenariam em túneis para dar origem a nova circulação. (FOLKMAN 76 , FOLKMAN ET AL 87)

Experimentos de implantes neoplásicos em órgãos perfundidos isolados demonstraram que o crescimento dos tumores sólidos eram dependentes da angiogênese. Uma vez que o tumor sobrevivesse qualquer aumento da população celular deveria ser precedido por um aumento dos novos capilares que convergissem para este implante. (FOLKMAN ET AL 87, FOLKMAN 90)

Os novos capilares assim formados viriam mais vigorosos e contínuos, se comparados com a neoformação vascular das feridas em cicatrização ou dos processos inflamatórios. Passou despercebido, entretanto, até há alguns anos, o fato de que a população das células tumorais e a população das células endoteliais dos capilares, dentro de uma neoplasia, formavam um ecossistema. Neste ecossistema, o índice mitótico das duas populações celulares dependeria um do outro. Células tumorais pareceriam estimular as células endoteliais; e, inversamente, as células endoteliais teriam um efeito indireto sobre a intensidade do crescimento tumoral. (FOLKMAN ET ALII 71)

Vários estudos experimentais sugeriram que uma mensagem bioquímica era enviada pelo tumor às células endoteliais da vizinhança, as quais, a partir de estado de repouso passariam a uma rápida reprodução de elementos, capazes de formarem novos brotos capilares, que cresceriam a uma velocidade de 1mm por dia. (FOLKMAN ET ALII 71)

Por outro lado, em certos tumores sólidos, estudos revelaram, a partir de modelos experimentais que, na ausência de neovascularização, eles permaneceriam em estado latente, com parada do seu crescimento, com dimensões de 2 a 3mm, até que a neoformação vascular fosse restabelecida para então rapidamente voltarem a crescer. (FOLKMAN ET ALII 71)

Gimbrone e seus colaboradores demonstraram este fenômeno num modelo experimental usando a córnea de coelhos. (GIMBRONE ET ALII 74)

Fundamentando-se na correlação da intensidade da angiogênese com a velocidade do crescimento tumoral e deste último ao estadiamento e prognóstico da doença neoplásica, alguns estudos passaram a ser publicados tentando atrelar aquele primeiro fato aos resultados clínicos obtidos.

Weidner e colaboradores levantaram a hipótese de que as lesões com pequena intensidade de angiogênese teriam uma baixa incidência de metástases, enquanto que neoplasias com alta intensidade de angiogênese, teriam alto potencial metastático. (WEIDNER ET ALII 93)

Estes autores demonstraram, ao estudar o câncer da próstata, que havia correlação estatisticamente significativa entre a densidade microvascular e a agressividade tumoral. Importantes conotações terapêuticas e prognósticos resultaram desta afirmativa. Os autores relataram igualmente que, em outras neoplasias, como a da mama e a do pulmão, o crescimento tumoral e as metástases dependiam da angiogênese. Afirmavam também que quanto maior fosse a densidade de microvasos maior seria a intensidade da ocorrência de lesões metastáticas. (WEIDNER ET ALLI 93)

Estes mesmos autores já haviam publicado um interessante trabalho sobre a angiogênese tumoral interpretada como fator prognóstico significativo e independente, no câncer de mama, em estadios precoces. A significância desta correlação permitiu aos autores sugerirem que este método fosse indicativo do uso de terapia coadjuvante. Nos casos de neoplasia da glândula mamaria, cujos linfonodos fossem negativos à dissecação e, onde houvesse grande intensidade de angiogênese e, por conseguinte, alto risco metastático, não se esperaria para iniciar quimio, radio ou imunoterapia. (WEIDNER ET ALLI 91)

Bosari e colaboradores repetiram estes achados, demonstrando haver significância na correlação da intensidade da angiogênese e prognóstico da neoplasia da mama (BOSARI ET ALLI 92)

A despeito de reconhecer tal correlação, Mahadevan e colaborador chamaram a atenção para outros fatores além da densidade de microcirculação, como fatores promotores das metástases neoplásicas e, por outro lado, afirmaram que a presença de angiogênese não quer, obrigatoriamente, significar que a disseminação neoplásica ocorreria. (MAHADEVAN ET AL 90)

Mlynek e colaboradores estudaram um método para determinar a microcirculação de neoplasias de cólon e reto; no entanto, não fizeram conotações prognósticas por ocasião do estudo de seus dez pacientes. (MLYNEK ET ALLI 85)

1.2 Objetivos

A literatura médica é escassa no que diz respeito a publicações referentes ao câncer colônico e retal e à intensidade de angiogênese o que nos motivou a elaborar alguns questionamentos a respeito, tais como:

- O câncer dos cólons e reto teriam o mesmo comportamento que as neoplasias malignas de mama, próstata e pulmão, no que se refere a angiogênese e prognóstico clínico?

- Como a angiogênese iria se comportar em diferentes estágios de diferenciação tumoral ?

- Haveria correlação da angiogênese com o prognóstico da doença e, por conseguinte, com o estadiamento tumoral, avaliado pela classificação de Dukes ?

- Os mesmos princípios que regem os prognósticos para o câncer da próstata, mama e pulmão, poderiam ser aplicados para os de cólon e reto, de forma que os resultados finais do tratamento da neoplasia maligna dos cólons e reto pudessem ser antecipados através da análise da angiogênese nos exames anatomo-patológico, feitos em fases iniciais da doença?

Foram estes questionamentos que motivaram a elaboração deste projeto de pesquisa.

Bacchi afirma que não podemos nos esquecer de que o campo da Patologia Diagnóstica tem que tirar todo o proveito dos novos métodos e novas idéias na área da pesquisa básica no sentido de tentar melhorar a acuracidade diagnóstica ou fornecer informações a respeito do comportamento biológico das neoplasias, que levariam a aplicações clínicas. O estudo da angiogênese tumoral é exemplo de mais um desses novos avanços. (BACCHI 95)

*MATERIAL E
MÉTODOS*

Capítulo 02

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O material estudado na presente monografia consistiu em blocos histológicos incluídos em parafina de pacientes portadores de câncer de cólon e reto, estudados pelos Professores Marco Aurélio de Quadros Cravo e Giovanni Loddo, orientador e co-orientador desta tese, respectivamente, Professores do Departamento de Patologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná e membros do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas.

As peças operatórias eram de pacientes operados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, na Casa de Saúde São Vicente e Hospital São Lucas, todos em Curitiba, Pr., onde atuam os referidos Professores e também médicos patologistas.

2.2 Métodos

Cento e vinte blocos histológicos foram tomados aleatoriamente de seus arquivos e os seus respectivos registros foram separados. Os dados referentes ao diagnóstico histológico, à identificação dos sexos e idades, às características da lesões (local e tamanho), ao estadiamento anatomo-patológico (classificação de Dukes) e à classificação histológica por diferenciação tumoral só foram conferidos nos referidos fichários, após o estudo imuno-histo-químico, afim de não influenciar nas contagens dos vasos.

2.2.1 Coloração por imunohistoquímica

Os blocos foram recortados e submetidos à coloração por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal JC/70A, DAKO-CD31, desenvolvido a partir de uma preparação de membrana de baço afetada por leucemia de células cabeludas e que reconhece uma glicoproteína ligada à membrana idêntica à do grupo de anticorpos monoclonais do CD31. (PARUMS 90, DAKO 92)

Técnica da Imunoperoxidase pelo método da Streptavidina (ABC)

1. Limpar as lâminas com xilol ou álcool absoluto
2. Banhar as lâminas em solução de cola e deixá-las secar em suporte a 90° (vertical) e a seguir remover os excessos nos bordos
3. Cortes finos em parafina (3 a 4 micrômetros) e secar em estufa a temperatura ambiente
4. Desparafinar junto com cortes positivos e negativos de controle em xilol P.A. frio, em três banhos
5. Re-hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico P.A. até água destilada
6. Remover o excesso de água
7. Inibição da peroxidase endógena
8. Lavar suavemente e deixar em banho com TRIS tampão por 10'
9. Remover o excesso de TRIS
10. Tripsinização. (tripsina a 0,1%) - deixar por 6' em estufa a 37°C, ou a temperatura ambiente
11. Lavar suavemente e deixar em banho com TRIS por 10'
12. Remover o excesso de TRIS
13. Aplicar o "blocking" por 10' em câmara úmida
14. Remover o excesso de "blocking" sem lavar
15. Aplicar o soro específico por uma hora em câmara úmida a 37°C, ou a temperatura ambiente

16. Lavar suavemente e deixar em banho com TRIS por 10'
17. Remover o excesso de TRIS
18. Aplicar o "Link" por 20' em câmara úmida
Lavar suavemente com TRIS e deixar em banho por 10'
19. Remover o excesso de TRIS
20. Aplicar o "Label" por 20' em câmara úmida
21. Lavar suavemente com TRIS e assim deixar por 5'
22. Revelar a reação com DAB em tabletes até atingir a cor acastanhada escura (controlar no microscópio)
23. Lavar em água e deixar em repouso por 10'
24. Desidratar e clarificar com xilol e manter com bálsamo.

Reagentes:

"Blocking": Solução salina tamponada com fosfato contendo proteína carreadora e azida sódica em concentração de 15mM

"Link": Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilada em solução salina tamponada com fosfato

Diluyente tampão de Streptavidina : tampão TRIS-HCl

Concentrado de Streptavidina: Streptavidina conjugada a imunoperoxidase no tampão TRIS-HCl contendo 15 mM de azida sódica.

As lâminas histológicas assim coradas foram levadas ao estudo microscópicos.

2.2.2 Exame microscópico

O exame microscópico foi efetuado em microscópio binocular duplo no qual o orientador desta tese efetuava, junto com o autor, as respectivas contagens.

O rastreamento inicial da lâmina era efetuado com 40 aumentos para definir as áreas onde havia concentração maior de vasos, denominadas de "hot spots" na literatura médica de língua inglesa. (Ilustração 1)

Tomava-se o cuidado de procurar os "hot spots" na periferia do tumor, fora da massa tumoral, longe das áreas inflamatórias, infiltradas por monomorfonucleares e polimorfonucleares, assim como de áreas de necrose tumoral. (Ilustrações 2,3,4,5,6,7).

Uma vez localizada a área de maior concentração de vasos era feito um segundo exame, agora, com 100 aumentos. Escolhida a melhor área para a contagem dos vasos, passávamos a 200 aumentos para assim proceder.

A contagem era efetuada em três campos microscópicos separados e cada um era dividido imaginariamente em quatro quadrantes. Os vasos de cada um destes quadrantes era contado e registrado em tabela própria. (BACCHI 95)

2.2.3 Registros

Os resultados da contagem destes três campos, (ou dos doze quadrantes) eram somados e daí retirado o valor da média aritmética. Este valor médio era então comparado ao estadiamento pela classificação de Dukes e ao grau de diferenciação tumoral.

Das cento e vinte lâminas obtidas, houve o aproveitamento de somente 55, que foram consideradas coradas por este método e cuja contagem de células endoteliais e vasos seria fidedigna. As demais foram rejeitadas devido às falhas de técnica de coloração que as inutilizaram.

Se considerarmos as contagens dos vasos em quatro quadrantes de cada um dos tres campos microscópicos, feitas em 55 lâminas, um total de 660 contagens constituíram os 660 números manipulados para os cálculos matemáticos. Contamos um total de 10.598 estruturas desde células epiteliais até vasos sangüíneos.

Os dados relativos à diferenciação tumoral pela classificação de Broders e à classificação de Dukes, assim como dos demais informes de interesse para o presente estudo, já estavam registrados nos arquivos referentes aos pacientes cujas lâminas foram o objeto desta tese.

Os respectivos dados não foram manipulados previamente para não comprometer o julgamento no momento da contagem dos vasos. Somente após o término desta contagem em todos os casos é que os arquivos originais foram manipulados para a obtenção das outras informações.

2.2.4 Avaliação Estatística

Estabelecemos os seguintes objetivos para estudar estatisticamente a fim de avaliar a importância da angiogênese no prognóstico das neoplasias malignas dos cólons e reto:

- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe G1 da classificação de diferenciação tumoral de Broders
- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe G2 da classificação de diferenciação tumoral de Broders
- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe G3 da classificação de diferenciação tumoral de Broders
- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe G4 da classificação de diferenciação tumoral de Broders
- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe A da classificação de estadiamento tumoral de Dukes

- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe B da classificação de estadiamento tumoral de Dukes
- Determinar o número médio de vasos sangüíneos para a classe C da classificação de estadiamento tumoral de Dukes
- Estabelecer eventuais diferenças, estatisticamente significantes, entre os números médios de vasos das classes G1, G2, G3 e G4 da classificação de diferenciação tumoral de Broders
- Estabelecer eventuais diferenças, estatisticamente significantes, entre os números médios de vasos das classes A, B e C do estadiamento tumoral da classificação de Dukes
- Estabelecer eventuais correlações estatísticas entre o aumento do número de vasos tumorais na medida em que aumenta a gradação de G1 para G4 de diferenciação tumoral pela classificação de Broders
- Estabelecer eventuais correlações estatísticas entre o aumento do número de vasos tumorais e o aumento da gradação, de A para C, de acordo com o estadiamento tumoral pela classificação de Dukes

O estudo estatístico foi realizado pelos Professores Ary Sabbag Junior e Paulo Ricardo Bittencourt Guimarães, ambos Professores Assistentes do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná.

Utilizaram para isto o programa "STATISTICA, Basic Statistics and Tables" da "Statsoft" (Anexo - estatística) a partir de uma planilha de trabalho do programa "Excel", Versão 5.0, da "Microsoft" (Tabelas nos 2,1, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5).

O método estatístico usado foi o da Análise da Variância, para 1 fator.

Testes de correlação estatística entre as variáveis não foram aplicados em função dos resultados obtidos pela Análise da Variância. (Anexo - estatística)

RESULTADOS

Capítulo 03

RESULTADOS

3.1 Os números absolutos

Foram estudados cento e vinte blocos histológicos dos quais puderam ser aproveitadas somente 55 lâminas coradas pelo método da imunoperoxidase para o CD31 às custas do anticorpo monoclonal DAKO - CD31, JC/70A.

As lâminas, que não foram aproveitadas para o estudo, foram rejeitadas devido à falta de coloração ou coloração defeituosa, assim como, a falhas no corte e preparo da lâmina, que comprometeram a qualidade da leitura histológica.

As lâminas aproveitadas foram as obtidas de peças cirúrgicas de 55 pacientes, 29 do sexo masculino e 26 do sexo feminino. Pertenciam respectivamente aos seguintes grupos etários:

35 a 40 anos	2 pacientes
41 a 45 anos	2 pacientes
46 a 50 anos	10 pacientes
51 a 55 anos	9 pacientes
56 a 60 anos	7 pacientes
61 a 65 anos	6 pacientes
66 a 70 anos	11 pacientes
71 a 75 anos	5 pacientes
76 a 80 anos	3 pacientes

Quanto ao local das lesões, elas foram encontradas respectivamente em :

ceco	4 pacientes
cólon ascendente	6 pacientes
ângulo hepático do cólon	3 pacientes
cólon transverso	4 pacientes
ângulo esplênico do cólon	1 paciente
cólon descendente	2 pacientes
cólon sigmóide	9 pacientes
junção reto-sigmoidiana	6 pacientes
reto	20 pacientes

Tratava-se de tumores de várias dimensões os quais foram agrupados segundo o seu maior diâmetro em:

0,1 a 2,5 cm	4 pacientes
2,6 a 5,0 cm	29 pacientes
5,1 a 7,5 cm	15 pacientes
7,6 a 10 cm	5 pacientes
10 ou + cm	7 pacientes

Quanto à diferenciação histológica ("grading") os pacientes foram divididos em :

Gradação G1	3 pacientes
Gradação G2	17 pacientes
Gradação G3	14 pacientes
Gradação G4	21 pacientes

Finalmente, o estadiamento pela classificação de Dukes permitiu-nos separar os pacientes da seguinte maneira:

Dukes A	5 pacientes
Dukes B	32 pacientes
Dukes C	18 pacientes

3.2 Resultados do tratamento estatístico

Os dados obtidos, tais como o número médio de vasos aferidos em cada uma das lâminas, as gradações da diferenciação histológica, segundo a classificação de Broders e classes do estadiamento tumoral, segundo a classificação de Dukes, apresentados em planilha de trabalho do programa "Excel", Versão 5.0 da "Microsoft", foram levados a análise estatística.

Foi utilizado o programa de computação denominado "STATISTICA, Basic Statistics and Tables" da "Statsoft", que foi operado pelos Professores Ary Sabbag Junior e Paulo Ricardo B. Guimarães, Professores Assistentes do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná.

Utilizando-se o método estatístico da Análise da Variância, foi possível estabelecer o que segue:

Broders	No total	média de vasos	desvio padrão
G1	3	16,5	9,535387
G2	17	16,42647	5,424744
G3	14	15,05357	3,951172
G4	21	15,87302	5,608749

Valor de $p = 0,908984$

DUKES	No total	média de vasos	desvio padrão
A	5	14,4	1,668124
B	32	16,35938	5,410581
C	18	15,40741	5,737582

Valor de $p = 0,677307$

Como não houve diferença estatisticamente significativa dos números médios de vasos entre os diferentes graus de diferenciação tumoral e entre as diferentes classes de estadiamento tumoral, decidiu-se não executar o estudo de correlação estatística das tres variáveis.

DISCUSSÃO

Capítulo 04

DISCUSSÃO

4.1 A angiogênese

O estudo da angiogênese tem se revestido de muita importância para certos tipos histológicos de neoplasias. O crescimento de um tumor além de um determinado tamanho exige o fenômeno da angiogênese. Há fortes indícios de que as metástases aumentem na medida que aumenta o número de vasos.(MACHIARINI ET ALLI 92)

Em órgãos perfundidos isolados, com tumores sólidos, a ausência da angiogênese ou prevenção da vascularização limita o crescimento de uma população celular a um pequeno diâmetro.(FOLKMAN 76)

Em enxertos tumorais submetidos a irradiação ao ponto de suprimir as mitoses não há interrupção da angiogênese. Este fenômeno sugere que a capacidade de neoformação vascular no tumor, que depende da síntese do Fator de Angiogênese Tumoral ocorre independentemente da frequência de mitoses.(FOLKMAN 76)

A capacidade de um tecido neoplásico de estimular a proliferação capilar está mediada por um material (Tumor Angiogenic Factor - TAF), secretado por células tumorais. O Fator de Angiogênese Tumoral é capaz de difundir-se através dos tecidos e atuar sobre os vasos do hospedeiro que se situam de 2 a 5 mm de distância da margem tumoral. Quando a célula tumoral sofre lise, partículas do citoplasma e do núcleo estimularão a angiogênese. O Fator de Angiogênese Tumoral tem sido extraído em cultura de tecidos, mais recentemente, sem a destruição celular.(FOLKMAN 76)

A neovascularização separa o desenvolvimento de um tumor em duas fases. A primeira, avascular e a segunda, vascular. A fase avascular consiste na agregação de células de um pequeno tumor, nodular, que nasceu de uma simples célula, implantada por metástase ou transplantada. Esta minúscula população com aproximadamente 10⁶ células forma uma massa tumoral com diâmetro menor do que 2 mm. Se a angiogênese não ocorre, esta população celular entra numa fase latente, dormente, como chama a literatura médica, onde a morte das células no centro do nódulo é compensada pela proliferação celular da periferia da lesão. Não ocorre mais crescimento. Na segunda fase, com a penetração de capilares nesta população celular avascular e esferóide ocorre o início de um rápido crescimento. (FOLKMAN 76)

Os experimentos tem demonstrado que os tumores malignos ou extratos derivados destes tumores induzem a neovascularização e que esta tem um importante papel na indução de um nódulo neoplásico crescer de forma incontrollável. (FOLKMAN 76)

Machiarini e seus colaboradores demonstraram que a densidade de microvasos foi um fator de predição de metástases no câncer de pequenas células do pulmão. Este estudo demonstrou que a intensidade de neo-vascularização correlaciona-se, independentemente de outros fatores, Ao desenvolvimento de metástases; e, por isso, extrapola a possível necessidade de identificar os pacientes que assim se comportam para submetê-los ao tratamento coadjuvante com quimioterapia antineoplásica parenteral sistêmica. (MACHIARINI ET ALI 92)

Srivastava e outros demonstraram o mesmo comportamento com melanomas cutâneos, encontrando valor prognóstico na intensidade da angiogênese na base do tumor a partir da comparação de grupos de pacientes livres de doença com os que tiveram recidiva. (SRIVASTAVA ET ALI 88)

Para a formação de um ponto metastático, uma célula (ou um grupo de células) deve ser capaz de deixar o tumor primitivo, invadir um tecido hospedeiro, entrar na circulação, parar no leito vascular a distância, extravasar no interstício ou parênquima de

órgãos alvos e proliferar como uma segunda colônia. Estes fenômenos se perpetuam graças a angiogênese que propicia o crescimento e disseminação das células tumorais.(LIOTTA ET ALLI 91)

Existem evidências de que muitas das neoplasias malignas se originam de lesões pré-neoplásicas que as antecedem. Um período pré-neoplásico, que pode durar vários anos, pode preceder estas lesões. Uma característica destas lesões pré-neoplásicas é a falta de neovascularização na maioria delas, se comparadas com as respectivas neoplasias malignas, que são ricamente angiogênicas. Esta virada do estado pré-vascular para o estado vascular pode ser acompanhado por um crescimento exacerbado da lesão e a eclosão de metástases.(FOLKMAN ET ALLI 89)

Weidner e seus colaboradores desenvolveram um estudo para definir a relação da densidade de microvasos com a sobrevida de pacientes, livres de recorrência, operadas de câncer de mama, em estadios clínicos iniciais. Basearam-se no fato que os linfonodos axilares têm sido o fator prognóstico mais importante nestas doenças mas não dá plenas contas do que irá acontecer com estas pacientes. Indicadores prognósticos mais acurados ajudariam a demonstrar quais os pacientes que seriam de maior risco para recidiva e óbito; e que, por isso, seriam candidatas a terapêutica coadjuvante sistêmica. Microvasos foram contados em lâminas de 165 pacientes, utilizando-se o método imunohistoquímico que detecta o antígeno relacionado ao fator VIII. Todos as pacientes com carcinoma de mama tendo mais de 100 microvasos por campo de 200 aumentos (200X) tiveram recidiva da neoplasia em média de 33 meses do diagnóstico comparado com menos de 5% das pacientes que tiveram menos que 33 vasos contados nas mesmas circunstâncias. Acima de tudo, a densidade de microvasos foi o único fator de predição estatisticamente significativa da sobrevida entre as mulheres sem linfonodos comprometidos nas peças cirúrgicas. Somente a densidade de vasos e a graduação histológica mostraram correlação estatisticamente significativa com tal sobrevida. Tal indicador seria útil na seleção daquelas pacientes que, não tendo linfonodos positivos nas peças, seriam de alto risco para recidiva neoplásica. Para estas deveria ser considerado o uso de terapia coadjuvante sistêmica.(WEIDNER ET ALLI 93)

Esta afirmativa já havia sido feita por Bosari e colaboradores. Igualmente estudaram a quantificação dos vasos como fator prognóstico do câncer de mama e afirmam que um número elevado de vasos pode significar angiogênese exacerbada e estar correlacionado com a agressividade do tumor. Estes valores foram comparados com outros parâmetros histológicos tais como ploidia e a fração da fase S e se mostraram independentes, no entanto, houve correlação com invasão vascular do tumor. Estes dados foram estudados estatisticamente por análise multivariada. (BOSARI ET ALI 92)

Horak e colaboradores confirmam estes achados estudando uma população de 103 tumores primários de mama. Seus dados afirmam que aquelas pacientes com contagens maiores dos vasos tiveram recidiva e óbito mais precoce. Estes autores também descrevem uma correlação entre vascularização e tamanho do tumor e entre os dois fatores e a presença de metástases. Outros marcadores como a amplificação do gen c-erb-2, coloração imunohistoquímica do p53, expressão do c-erb-2, ensaio do receptor de estrógeno e do receptor do fator de crescimento epidérmico foram estudados neste trabalho e não houve correlação com a angiogênese (HORAK ET ALI 92).

GIMBRONE e colaborador demonstraram em modelo experimental de câncer de mama de ratos implantados em íris de coelhos o mesmo valor prognóstico da angiogênese como fator preditivo de comportamento biológico destes tumores. (GIMBRONE ET AL 76)

Weidner e colaboradores estudaram o fenômeno da angiogênese tumoral Para saber a correlação do comportamento da microcirculação com o carcinoma da próstata; 74 lâminas de 74 pacientes foram examinadas e os vasos foram contados. Eram carcinomas invasivos iniciais, 29 com e 45 sem metástases. Os vasos foram corados pela imunocoloração para o antígeno do fator VIII. Sem o conhecimento do estadió clínico da doença os vasos foram contados num campo de 200 aumentos (0,739 mm²). A hipótese a ser testada era se as lesões que mostraram pequeno grau de angiogênese teriam uma incidência baixa de metástases, em oposição às lesões ricas em angiogênese se teriam rico potencial metastático. Demonstrou-se nestes estudos uma forte correlação

entre a densidade dos microvasos corados por F8-RA (Factor VIII Related Antigen) e a incidência de metástases nestes carcinomas de próstata.(WEIDNER ET ALLI 93)

Outros autores confirmaram os achados de Weidner. Os estudos de Wakui e colaboradores demonstraram que o aumento da angiogênese no câncer prostático correlaciona-se ao desenvolvimento de metástases em medula óssea.(WAKUI ET ALLI 92)

Weidner e colaboradores afirmam que estes resultados aumentam o conhecimento acerca do papel da angiogênese no crescimento e metástases dos tumores humanos.Demonstraram também uma evidência adicional de que o crescimento tumoral é dependente da angiogênese. (WEIDNER ET ALLI 93)

Este foi um dos vários trabalhos que nos fizeram questionar se os adenocarcinomas de cólons e reto teriam o mesmo comportamento. (WEIDNER ET ALLI 93)

Espelhados no trabalho de Weidner e colaboradores também deixamos para consultar os registros das fichas dos pacientes quanto a classificação de Dukes e diferenciação tumoral somente após o término das contagens dos microvasos. Srivasvatava ao estudar o significado do prognóstico da intensidade da vascularização em melanomas cutâneos, também tomou o cuidado de não identificar as lâminas antes de tê-las examinado. (SRIVASTAVA ET ALLI 88, WEIDNER ET ALLI 93)

A ocorrência da angiogênese é geralmente um pré-requisito necessário para a formação de tumores secundários. A sua presença não é uma certeza de que esta disseminação ocorra. A disseminação das células constitui um fenômeno complexo, típico das neoplasias malignas e pode ocorrer independentemente da angiogênese. Células que se destacam do tumor principal podem invadir localmente infiltrando espaços intercelulares vizinhos, invadir bainhas nervosas, ou simplesmente cair nas cavidades naturais e daí sofrer disseminação. A disseminação pela circulação, entretanto, tem merecido especial atenção.

Novos estudos de profilaxia e tratamento de metástases tumorais tem definido como alvo o leito vascular neoformado.

(MAHADEVAN ET AL 90, HORAK ET ALLI 92)

Se for possível controlar a angiogênese tumoral através de drogas anti-angiogênicas talvez possa ser controlado o prognóstico da neoplasia. Reside aí a grande importância destes estudos. (HORAK ET ALLI 92)

Vários são os fatores desencadeadores da angiogênese. Ora são os que agem de forma direta sobre células endoteliais e que estimulam sua locomoção e mitose, ora os que agem indiretamente em outras células do hospedeiro, tais como os macrófagos, para a liberação de fatores de crescimento endotelial. (FOLKMAN ET AL 87)

O crescimento contínuo de uma neoplasia sólida é sempre associado à neovascularização. Um possível mediador seria o Fator de Angiogênese Tumoral, um mitógeno à célula endotelial, que tem sido extraído de uma série de tumores sólidos malignos. O bloqueio específico deste fator, "anti-angiogênese", tem sido proposto como uma nova forma de controlar o crescimento maligno. Há evidências que deva existir uma relação fundamental entre a angiogênese e a habilidade do tumor de crescer de forma maligna. Gimbrone e colaboradores demonstraram experimentalmente que o crescimento de um tumor maligno pode ser interrompido ao ser interrompida a neovascularização. (GIMBRONE ET ALLI 72)

A fração protéica, não-histona, extraída do núcleo de células neoplásicas malignas foi demonstrado como sendo um fator mitogênico para células endoteliais. Quando implantado em córnea de coelhos, causa proliferação do endotélio vascular e neoformação de vasos sanguíneos. (TUAN ET ALLI 73)

Inibidores da angiogênese, que não são citostáticos in vitro, foram demonstrados como sendo inibidores do crescimento tumoral in vivo. Um análogo sintético da fumagalina, por exemplo, um antibiótico natural secretado pelo *Aspergillus fumigatus fresenius*, inibe a proliferação endotelial in vitro e a angiogênese induzida por tumor in vivo. Esta "angioinibina", também chamada de AGM-1470, assim como outros análogos, tem sido demonstrados como sendo supressores de crescimento tumoral com mínimos efeitos colaterais. Tais substâncias poderão, futuramente, ser muito úteis como agentes

quimioterápicos anti-tumorais. (INGBER ET ALLI 90, WEIDNER ET ALLI 93)

A dimensão deste mundo novo de pesquisas e especulações é um farto campo de trabalho. Nossa intenção se prende a um pequeno detalhe da base desta grande pirâmide, que é a de determinar se há ou não correlação da angiogênese nos adenocarcinomas de cólon e reto com outros fatores prognósticos conhecidos, tais como o da diferenciação tumoral pela classificação de Broders e do estadiamento pela classificação de Dukes.

4.2 Classificações, estadiamento e prognóstico

Inúmeras classificações do câncer de cólons e reto têm se preocupado com o prognóstico da doença e por isso são criadas, modificadas e alteradas no decorrer do tempo.

A classificação de Dukes, descrita inicialmente por Cuthbert Esquire Dukes, em 1932, já foi modificada várias vezes, como relata a literatura médica. Em 1949 foi alterada por Kirklin e colaboradores, em 1954 por Astler e colaborador e, finalmente, por Turnbull em 1967. As várias modificações que alteraram a classificação de Dukes original não fugiram, entretanto, do princípio de que a invasão da lesão através da parede e a disseminação linfonodal seriam de valor prognóstico para o câncer colo-retal. (DAVIS ET AL 83, JASS 88, HARRISON ET ALLI 94)

A propósito, o conceito de que o prognóstico do câncer colo-retal está atrelado a invasão da neoplasia na parede do órgão e a sua disseminação linfonodal antecede a publicação da classificação de Dukes. Esta proposta foi publicada por Lockhart-Mummery e o próprio Dukes em 1928. (BEART ET ALLI 78)

Dukes descreve a lesão do tipo A como sendo a que alcança a camada muscular própria do cólon e reto porém não a ultrapassa e não apresenta metástases. A do tipo B seria a neoplasia que atravessaria a muscular própria, invadindo ou não a serosa ou tecidos adjacentes, porém, sem metástases; e as do tipo C, lesões de qualquer tipo que envolvessem metástases.

As discussões quanto à necessidade de se dividirem as gradações nos subgrupos B ou C, ou quanto ao mérito das alterações que a classificação sofreu no decorrer do tempo, foge da finalidade desta monografia.

As classificações da Union Internationale Contre le Cancer (UICC), pTNM da American Joint Committee for Cancer Staging (AJC) e a Australian Clinicopathological Staging System (ACPS) também utilizam a profundidade de invasão da lesão, o comprometimento linfonodal e a presença de metástases para estabelecer o prognóstico do câncer colo-retal. Comparação entre estas classificações, assim como das modificações de Astler-Coller, não demonstraram muitas vantagens ou diferenças prognósticas sobre a classificação original de Dukes. (HENRICHSEN ET AL 89)

A classificação de Dukes, utilizada para a gradação das lesões estudadas nesta monografia, prende-se à publicação original, qual seja, a da lesão ultrapassar ou não a camada muscular própria, invadir ou não a serosa ou gordura peri-retal e à presença de vasos linfáticos ou de linfonodos comprometidos na análise da peça operatória. (MORSON ET AL 90)

Como nos registros dos serviços de anatomia patológica, dos quais as peças cirúrgicas foram estudadas, não constavam os detalhes clínicos ou cirúrgicos, mas tão somente os referentes aos exames anatomo-patológicos, esta foi a forma de utilizarmos a classificação de Dukes.

A classificação introduzida por Broders teve como finalidade a de graduar a diferenciação tumoral e foi adotada pela Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization). A terminologia oficializada para esta classificação foi a de: "bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado ou mal diferenciado". (DAVIS ET AL 83)

As características do adenocarcinoma bem diferenciado do cólon lembram a estrutura histológica normal do órgão e o pobremente diferenciado, em oposição, guarda pouca semelhança

com o tecido original. O moderadamente diferenciado constitui uma gradação intermediária entre os dois extremos. Existe uma correlação das diferentes gradações desta classificação com o prognóstico e sobrevida do câncer dos cólons e reto. (DAVIS ET AL 83, HALVORSEN ET AL 88, MORSON ET AL 90)

Um quarto grau foi anexado à classificação original: o indiferenciado, neoplasia de pior prognóstico e que se caracteriza por formar uma massa celular sólida na maior parte das vezes; e, em outras, tomar uma forma fascicular ou uma forma acinar incompleta. (MORSON ET AL 90)

A classificação segundo a diferenciação histológica tem o seu espaço na publicação da UICC - International Union Against Cancer intitulada TNM, Classification of Malignant Tumours e ali então denominada Histopathological Grading (G). Desta maneira, GX, seria uma gradação não determinada, G1 seria a bem diferenciada, G2, a moderadamente diferenciada, G3, a pobremente diferenciada e finalmente G4, a indiferenciada. (HERMANEK ET AL 87)

São inúmeros os métodos de avaliação prognóstica das neoplasias colo-retais. Diferentes maneiras de gradação destas neoplasias podem se basear em exames histopatológicos rotineiros, em exames morfológicos, exames bioquímicos, imunocitoquímicos, imunquímicos, em cultura de tecidos, citometria de DNA, etc. (Tab no 1) (JASS 88)

A expressão de oncogenes, a detecção de mutação em anti-oncogenes, a evidência de maior fração de células recrutadas para o ciclo celular têm sido motivo de pesquisa na moderna área da biologia molecular. Expressões anômalas de oncoproteínas, como a p53 mutada, marcadores de proliferação celular como o antígeno Ki-67, que através do anticorpo monoclonal MIB 1 pode detectar fases da reprodução celular, assim como da expressão do PCNA e PC10, estão sendo ensaiados como fatores prognósticos nestas neoplasias digestivas. (GAYOTTO ET AL 94).

Neoplasias dos cólons e reto foram estudadas quanto à provável existência de micrometástases em linfonodos aparentemente não comprometidos. Foi possível a demonstração do comprometimento destas estruturas através da detecção do

antígeno carcinoembriônico e citoqueratina, por métodos imunohistoquímicos. Estes achados colocam em questionamento as classificações de prognóstico que se baseiam no comprometimento linfonodal. (CUTAIT ET ALLI 91)

A citometria de DNA, de fluxo ou de imagem, tem sido proposta para auxiliar o estadiamento das neoplasias do grosso intestino; e, pela análise da ploidia celular, pode-se extrapolar a agressividade maior ou menor da doença. Isto tem valor não só no prognóstico da doença mas também no estabelecimento da terapêutica coadjuvante em casos limítrofes. (ZERBINI ET AL 94)

Frente a tantas maneiras sofisticadas de estabelecer o prognóstico das neoplasias colo-retais, escolhemos o método imunohistoquímico da avaliação da angiogênese tumoral.

As neoplasias não se comportam de igual maneira quanto à angiogênese. Isto já foi demonstrado por Brem e colaboradores ao estudar diferentes tumores e classificá-los dentro de uma faixa que oscila entre os denominados "endotélio-pobres", (exemplificado por um dos extremos), o condrosarcoma, e os chamados "endotélio-ricos", cujo exemplo seria o glioblastoma. Definiram o que foi nomeado como "Microscopic Angiogenesis Grading System" (MAGS) e construíram uma fórmula com três componentes: vasoproliferação, hiperplasia de células endoteliais e citologia endotelial. Quantificaram estes valores, que eram avaliados no exame microscópico, e criaram um índice que corresponde ao "MAGS", a partir do qual foi possível classificar uma série de neoplasias. O único adenocarcinoma estudado foi o de mama que de um "MAGS" de 0 a 100, recebeu o índice de 44. Não há menção para os adenocarcinomas de cólons e reto. (BREM ET AL 72)

O adenocarcinoma colo-retal foi estudado por Mlynek e colaboradores, porém, esta publicação preocupou-se mais com o método imunohistoquímico de coloração dos vasos do que com a angiogênese tumoral como fator prognóstico da doença neoplásica. As informações, no entanto, nos foram muito importantes. Demonstraram que a distribuição de vasos na neoplasia foi irregular e sem homogeneidade ao contrário da regularidade de distribuição

vascular na mucosa normal. Em quase todos os dez casos estudados a mucosa normal foi muito rica em vasos enquanto que a do tumor foi pobre quando assim comparada. O número de vasos na neoplasia era menor do que na mucosa normal. A contagem também era muito variada oscilando entre 69,4 a 26,8.(Mlynek ET ALI 85)

Os dados da nossa presente pesquisa não ficam longe do relato de Mlynek. Tivemos muita variação nas contagens e encontramos muita irregularidade na distribuição dos vasos nas lâminas estudadas.

No início deste projeto, este foi o único trabalho encontrado na literatura, ao nosso alcance, que abordava o câncer dos cólons como objeto de pesquisa. Como o número de casos estudados foi pequeno (10 pacientes) e o método de coloração foi comprometido, pois corava outros elementos celulares diferentes das células endoteliais, pensamos obter outros achados, mormente quando correlacionados aos fatores prognósticos conhecidos.

Por outro lado, esta falta de homogeneidade, encontrada na distribuição dos vasos tumorais, justifica o que a literatura propõe, ou seja, a escolha dos "hot spots", áreas de maior densidade vascular, onde as contagens são realizadas.

Mlynek conclui dizendo que a distribuição dos vasos nos tumores coloretais é irregular e que isto pode significar que todo o tumor contém áreas nas quais as células neoplásicas podem estar razoavelmente bem supridas com oxigênio, enquanto que em outras regiões, o suprimento poderá estar marcadamente deficiente. Nas primeiras áreas, a irradiação tumoral poderia ser muito mais eficiente do que nas segundas. Daí se extrapola a possibilidade de que qualquer neoplasia maligna colo-retal pudesse conter um variado número de compartimentos celulares que difiram numa determinada extensão um dos outros, no que diz respeito a sua radiosensibilidade oxigênio dependente. (Mlynek ET ALI 85)

4.3 A imunohistoquímica e as colorações

As técnicas de coloração convencionais tais como as que utilizam a coloração de tecido elástico e reticulina, oferecem pequena ajuda para avaliar a microcirculação linfática e sanguínea. (LEE ET ALLI 86)

A grande maioria dos métodos de estudo, descritos para contagem dos microvasos tumorais, se fundamenta na coloração por imunohistoquímica, utilizando a técnica da imunoperoxidase ou outra, sendo o corante carregado por um anticorpo monoclonal que o fixa a um determinado sítio antigênico celular. (BOURNE 93)

Os anticorpos monoclonais diferem, portanto, de acordo com diferentes alvos, ou seja, diferentes substratos antigênicos. (BOURNE 93)

Uma simples molécula do antígeno contém várias determinantes características, também chamadas de epítomos. Quando um antígeno é injetado num animal os linfócitos B formarão os respectivos anticorpos. Um linfócito B forma anticorpo para um determinado epítomo. Desde que existam muitas células B e cada uma forme o anticorpo para o seu determinado epítomo, a totalidade obtida consiste no denominado anticorpo policlonal, ou seja, de muitas células. Em determinadas técnicas laboratoriais, quando se deseja o anticorpo para um epítomo específico, faz-se a cultura celular de um tipo específico de célula B, denominado clone. O anticorpo assim obtido é denominado monoclonal. (BOURNE 93)

O linfócito B, assim especializado para o epítomo de nossa preferência, é colocado em cultura de células de mieloma múltiplo, neoplasia de células B, que tem como característica ser um monoclonal. Desta fusão nasce um hibridoma, que produzirá continuamente o mesmo anticorpo. Daí é extraído o anticorpo monoclonal que carregará o corante específico e terá como alvo o respectivo antígeno, que, no caso em particular, seria um determinado sítio da célula endotelial. (BOURNE 93)

Os métodos de coloração que utilizam a imunoperoxidase podem ser diretos ou indiretos. Chamam-se diretos, quando o

anticorpo monoclonal é ligado diretamente à peroxidase; chama-se indireto, quando um anticorpo monoclonal liga-se ao epítipo a estudar e um segundo anticorpo específico liga-se a este, agora carregando consigo a peroxidase. (BOURNE 93)

Outro método utilizado é o PAP. Neste método utiliza-se um anticorpo monoclonal primário, um secundário e o complexo PAP, compreendendo a enzima peroxidase e um anticorpo contra a peroxidase. O anticorpo primário é específico para o antígeno a estudar. O anticorpo secundário é o de ligação, tanto específico a este primário como ao complexo PAP. (BOURNE 93)

O método da avidina-biotina, também comumente utilizado, baseia-se na habilidade da glicoproteína avidina, da clara do ovo, de ligar-se, não imunologicamente, a quatro moléculas da vitamina biotina. Assim como no método PAP, são utilizados três reagentes: o primeiro é um anticorpo específico ao antígeno a ser localizado, um segundo anticorpo, com dupla função, é capaz de ligar-se ao primeiro antígeno e também se liga à biotina. Os sítios da molécula de avidina que são ligáveis à biotina, se encarregam desta última ligação. A peroxidase vai unida no complexo avidina-biotina. (BOURNE 93)

O método por nós empregado corresponde ao da avidina-biotina ("Streptavidin-biotin"). (DAKO 92)

4.4 A quantificação da angiogênese

Em resumo, o intuito da presente pesquisa é o de identificar por método de imuno-coloração, por meio de marcadores monoclonais, as células endoteliais, em lâminas microscópicas, de neoplasias de cólons e reto.

A quantificação dos microvasos se inicia por uma varredura em pequeno aumento (40X) e depois com 100 aumentos (100X) para determinar áreas de maior densidade de microcirculação. (Ilustrações 1 e 2) Isto feito, inicia-se exame com 200 aumentos e escolhem-se três áreas para a contagem destas estruturas vasculares. A média destas três contagens é registrada.

Vasos com calibre acima da espessura de oito eritrócitos, vasos com paredes musculares grossas e vasos em áreas de esclerose ou fibrose são excluídos da contagem. Células endoteliais únicas ou em aglomerados são contados como vasos. A contagem é efetuada por um patologista experiente em métodos imunohistoquímicos e pelo pesquisador. As contagens são expressas em número de vasos por campos de 200 aumentos. (BOSARI ET ALLI 92)

Os anticorpos monoclonais, como previamente afirmado, são frequentemente utilizados na demonstração dos microvasos nos tecidos neoplásicos.

Dentre os métodos de coloração descritos por de Young e colaboradores para avaliação da angiogênese encontramos as técnicas descritas para identificação do antígeno relacionado ao Fator VIII (FVIII-RA) e para a os isoantígenos dos grupos sanguíneos ABH, para a aglutinina I do *Ulex europeus*, para trombomodulina, antagonista do FVIII-RA, para CD 34 e CD 31. (DE YOUNG ET ALLI 93)

Segundo os mesmos autores, a pesquisa de um marcador imunológico sensível e específico para endotélio até agora não alcançou a perfeição, pois o costumeiro entusiasmo inicial tem sido seguido de freqüentes desapontamentos. (DE YOUNG ET ALLI 93)

O antígeno relacionado ao fator VIII (VIII-RA) foi inicialmente tido como de alto grau de especificidade; no entanto, após uma série de estudos, foi possível demonstrá-lo somente em 50% das lesões vasculares benignas e mesmo em poucas proliferações endoteliais malignas. (DE YOUNG ET ALLI 93)

Há relatos de que, além da falta de coloração, ocorre reação cruzada deste antígeno com células do carcinoma, o que diminui a confiabilidade do método. (PARUMS ET ALLI 90)

Na experiência de Lee e colaboradores o método do FVII-RA no câncer de mama traz algumas vantagens e respectivas desvantagens. Tem especificidade para o endotélio e não reage com outras estruturas; no entanto, fica mascarado em sítios fixados por

formalina. Há necessidade de tratamento do espécimen com enzimas proteolíticas como a tripsina, antes da imunocoloração, a fim de expor o local do antígeno relacionado ao Fator VIII. (LEE ET ALLI 86)

A aglutinina I do *Ulex europaeus*, que reconhece o terminal glicosil residual do antígeno H dos eritrócitos e das células endoteliais, foi reconhecida como altamente sensível, por marcar aproximadamente 90% dos tumores endoteliais. Entretanto, esta proteína liga-se a vários tumores não vasculares, incluindo sarcoma epitelióide e alguns carcinomas metastáticos. (DE YOUNG ET ALLI 93)

Outro inconveniente descrito é de que antígenos ABH, como marcadores endoteliais, também são expressos por epitélio mamário e um pequeno número de carcinomas de mama o que interferiria com os resultados da contagem de vasos nas neoplasias de mama. (LEE ET ALLI 86)

Srivastava e colaboradores utilizaram este método para estudar o significado da intensidade de vascularização em melanomas cutâneos e concluíram que a percentagem em área vascularizada na base do tumor, no grupo em que ocorreu recidiva, foi mais de duas vezes maior do que no grupo livre da doença. A partir daí concluíram que este achado seria de valor prognóstico. Durante a exposição de sua metodologia mostram-se satisfeitos com o tipo de coloração utilizada. (SRIVASTAVA ET ALLI 88)

Devido ao relato de que a aglutinina I do *Ulex europaeus* também coraria o epitélio de neoplasias colônicas, ela seria um mau corante para o presente estudo. (PARUMS ET ALLI 90)

A trombomodulina, um antagonista do antígeno relacionado ao fator VIII (FVIII-RA), também foi testada para estas finalidades apresentando como vantagem sobre o FVIII-RA sua forte positividade na maioria dos tumores endoteliais, inclusive o angiossarcoma. Ela tem como desvantagem o fato de corar outros tumores como os trofoblásticos, os adenocarcinomas, mesoteliomas e os carcinomas de células escamosas adenoides. Este último pode mimetizar histologicamente o angiossarcoma epitelióide, porém, tem diferente comportamento clínico. (DE YOUNG ET ALLI 93)

A localização da laminina e do colágeno tipo IV na membrana basal também constituem métodos para o estudo da microcirculação. A laminina é localizada em volta dos capilares sangüíneos e está ausente nos linfáticos. É útil para esta diferenciação. Estas duas substâncias têm como inconveniência de uso a dificuldade para a sua localização imunohistoquímica em peças fixadas por formalina e em blocos de parafina. É útil em exames de congelação, ou necessita de tratamento prévio com digestão protéica às custas de enzimas proteolíticas. O anticorpo monoclonal anti-laminina (Unidade GP-2) está disponível no mercado e é utilizado para exames de congelação. (LEE ET ALLI 86)

Outros anticorpos monoclonais como PAL-E e BAW-200 também foram descritos como úteis na detecção de células endoteliais de tumores, pois identificam diferentes sítios dos detectados pelo FVIII-RA. A seletividade para pequenos capilares e a falta de coloração para vasos maiores constitui um dos óbices desta metodologia. (LEE ET ALLI 86)

O mesmo acontece para outro anticorpo monoclonal, o BMA 120, utilizado por Smolle e colaboradores, que tem especificidade por endotélio de pequenos capilares. Estudando melanomas estes autores tiveram dificuldade em corar vasos maiores. Eram identificados por sua estrutura conhecida e não pela imunocoloração. (SMOLLE ET ALLI 89)

Recentemente, marcador para o CD 34 foi divulgado na literatura científica como sendo um marcador endotelial específico, mas logo teve quem contestasse esta afirmativa. A imunocoloração para o CD 34 também foi obtida em vários tumores não vasculares incluindo sarcomas epiteliais, tumores malignos de bainhas de nervos periféricos, leiomiossarcomas e sarcomas de células claras. (DE YOUNG ET ALLI 93)

O CD 31 é uma glicoproteína de cadeia simples, de 130 kilodaltons, que é normalmente observada nas células endoteliais e nos elementos hematopoiéticos em ambas as fases circulantes e tissulares. No endotélio é um componente da membrana que intermedia a adesão plaquetária ao endotélio. É possível, desta maneira, que esta molécula possa representar um marcador

endotelial confiável e a literatura tem demonstrado, através de publicações, a confirmação de tal assertiva. (DE YOUNG ET ALLI 93)

O marcador anti-CD31 é constituído pelo anticorpo monoclonal JC/70A. (DE YOUNG ET ALLI 93)

Battifora afirma que a despeito do FVIII-RA ser mais específico o CD34 e mais ainda o CD31 são mais sensíveis na detecção da linhagem epitelial. (BATTIFORA 93)

Horak e colaboradores estudaram o CD31, também conhecido como endo-CAM-1 (endothelial cell adhesion molecule) e PECAM-1, (platelet/endothelial cell adhesion molecule), tendo demonstrado comparativamente com outros marcadores, inclusive o FVIII-RA, CD34 e CD36, que constitui o método mais sensível e que corou uniformemente os microvasos estudados. (HORAK ET ALLI 92)

Folkman e colaboradores, utilizaram como marcador epitelial a anti-laminina. Estudaram por este método imunohistoquímico, em cultura de células, a indução de angiogênese durante a transição de hiperplasia para neoplasia. (FOLKMAN ET ALLI 89)

Não encontramos subsídios na literatura corrente que colocassem os anticorpos anti-laminina como a melhor opção, quando comparados ao anti-CD31, para demonstrar a microcirculação tumoral.

Mlynek e colaboradores utilizaram a técnica histoquímica de demonstração da fosfatase alcalina, altamente presente em células endoteliais dos capilares arteriais e o fizeram em dez casos de câncer de cólons e reto. Relataram que os capilares venosos não são corados. Mencionaram em seu trabalho outros métodos para demonstração da microcirculação tumoral como perfusão com tinta de Índia, microangiografia, coloração seletiva de eritrócitos e colorações para elastina (presente nos vasos maiores e ausente nos capilares). (MLYNEK ET ALLI 85)

O DAKO-CD31, JC/70A é um imunógeno preparado a partir da membrana de baço de paciente com leucemia de células

cabeludas que reage com glicoproteínas das células endoteliais e plaquetas em lâminas de tecidos normais e em neoplasias. Esse imunógeno, em cortes de criostatos e esfregaços de sangue também marca megacariócitos, plaquetas e ocasionalmente plasmócitos. Reage fracamente com linfócitos B, T e com neutrófilos. (DAKO 92)

Outro fato favorável ao uso deste marcador é a utilização de blocos de inclusão em parafina e fixados com formalina. A digestão com enzimas proteolíticas como a tripsina e a pronase, consiste num estágio que precede a coloração pelo JC/70A. A seguir, os métodos como a da imunoperoxidase, fosfatase alcalina e fosfatase anti-alcalina e avidina-biotina, podem ser utilizados. (DAKO 92)

Existem situações de dificuldade quanto à demonstração da angiogênese, como as relatadas por Bosari e colaboradores: a heterogenicidade dos microvasos decorrentes da presença de inflamação, necrose ou esclerose tecidual. Além disso, a coloração de mastócitos pode mimetizar a presença de células endoteliais. (BOSARI ET ALI 92)

Este fato pode ser observado na ilustração 4 do presente material, área que foi evitada para a contagem de vasos. Intenso infiltrado linfoplasmocitário envolve um número acentuado de vasos neoformados.

Mlynek e colaboradores, ao estudar dez casos de câncer dos cólons e reto, criticaram e chamaram a atenção para a falta de distribuição homogênea dos capilares, ou seja, existem áreas com farto suprimento de oxigênio comparadas a outras áreas com escassa densidade de microcirculação. Este fato compromete as interpretações dos estudos a respeito. (MLYNEK ET ALI 85)

O freqüente achado de reação inflamatória nas lâminas estudadas faz suspeitar que os cólons e o reto, por serem órgãos estruturalmente diferentes da próstata e da mama, pois estão expostos permanentemente à agressiva flora bacteriana, poderiam comportar-se de forma diferente, quando analisados sob o aspecto angiogênese tumoral.

Weidner e co-autores recomendaram, no decorrer da técnica laboratorial, determinar a densidade dos microvasos por microscopia de menor aumento, procurando em áreas de invasão tumoral a maior densidade microvascular. O achado destas áreas, que denominou de "hot-spots" foi feito varrendo-se os campos com quarenta aumentos (40X) e depois com cem aumentos (100X) e identificando os vasos corados pela imunoperoxidase. Estes "hot-spots" poderiam ocorrer em qualquer posição da neoplasia, porém, mais frequentemente se encontravam nas margens do tumor. As áreas de microvascularização eram classificadas de 1+ a 4+, ou seja, com leve, intermediária e intensa densidade vascular. As contagens individuais dos microvasos eram feitas em campos de duzentos aumentos (200X), ou objetiva de vinte aumentos (20X) com ocular de dez aumentos (10X). A correspondência em área era de 0,7386 mm² para um campo de duzentos aumentos (200X). (WEYDNER ET ALLI 92)

A técnica assim empregada por Weidner desconsideraria as afirmativas pessimistas de Mlynek quanto à confiabilidade de resultados. (WEYDNER ET ALLI 92, MLYNEK ET ALLI 85)

Hart chama a atenção para o fato de que a contagem dos vasos deva ser executada nas margens do tumor e dessa maneira se procedeu no presente estudo. (HART ET AL 92)

4.5 Sobre os resultados obtidos

O presente estudo revestiu-se de certas peculiaridades inerentes ao modelo experimental. Inicialmente, deparou-se com a dificuldade de comparar os achados da literatura médica em exames de vísceras sólidas, como a próstata e a mama, aos achados do cólon, víscera oca, nos quais há um frequente componente inflamatório que dificulta a escolha dos "hot-spots". Por esta razão, quertionar-se-ia se os resultados encontrados na mama e na próstata poderiam ser extrapolados para o cólon.

Pode-se observar nas ilustrações de números 1 a 4 que sempre existe algum grau de inflamação crônica que acompanha a lesão.

Um segundo ponto a ser considerado é quanto ao número de aumentos utilizados no microscópio para a análise dos achados. Em 200 aumentos, usados para a demonstração e contagem de células endoteliais e vasos sanguíneos, a identificação de reação inflamatória e suas respectivas células não parece ser tão fácil como seria em aumentos maiores.

Em 400 aumentos pode-se, com mais facilidade, identificar as células endoteliais isoladas, como é demonstrado na ilustração 3.

Na ausência de reação inflamatória a contagem torna-se fácil e fidedigna. Mesmo assim, o encontro de elementos como os plasmócitos, que se coram em marrom, a semelhança das células endoteliais, pode confundir a contagem. A minuciosa observação da textura da célula permite a diferenciação entre estes elementos.

Ao se submeterem os dados numéricos de angiogênese, os da diferenciação histológica e os do estadiamento tumoral à análise estatística, pôde-se constatar que não houve significância demonstrável pelo teste da Análise da Variância para um fator. Isto quer dizer que a classificação de Broders e a de Dukes não se correlacionam com a intensidade da angiogênese (que foi muito útil, segundo a literatura médica já apresentada, para as neoplasias malignas de mama, próstata, pulmão e outros); e, por conseguinte, este dado, que tinha importante valor prognóstico, para aquelas lesões, não o tem para o cólon.

Dados negativos não tinham sido publicados e a bibliografia, que foi acessível no início deste protocolo, era pobre em relação a tal informação. Surpreendeu tal área carecer de pesquisa. Agora entende-se que os resultados desanimadores talvez tenham sido a causa deste silêncio literário.

As diferenças estruturais entre uma víscera ôca, com textura histológica diferente, dimensões diferentes, exposição a bactérias e outras muitas características a especular, talvez pudessem ser a causa do comportamento do câncer do cólon diferir das neoplasias malignas de órgãos sólidos, como a mama, próstata e pulmão.

As descrições tão bem amparadas em protocolos bem controlados e estudos estatísticos fiéis que afirmam que a angiogênese é um fator fidedigno de prognóstico para o câncer de mama, próstata e pulmão, não podem ser repetidas para o câncer dos cólons e reto como pudemos demonstrar.

Resta aqui, no entanto, a importante lição de perseverança na busca das verdades científicas

TABELAS

Tabela 1 - Métodos de avaliação prognóstica das neoplasias colo-retais

Metodologia	Aplicações gerais	Exemplos
Hispatologia de rotina	Diferenciação	Config. dos túbulos
		Polariidade nuclear
	Resposta do hospedeiro	Freq. de mitoses
		Tamanho e forma nuclear
		Fibrose
Padrão de crescimento	Infiltração linfocit.	
	Reação linfonodal	
Morfométrico (Computação)		Expansivo e infiltrat
		Vanação da forma e tamanho nuclear
Bioquímico	Peptidases	Catepsina B
		Colagenase
		Uroquinase
Imunocitoquímico	Antígenos de diferenciaçã	Component. secret.
		Antígenos ABO
	Antígenos tumorais	Estrut. desconhec.
		como CEA, CMA, SIMA, nucleares
		Estrut. conhecidas
		Antígenos de grupos sanguíneos
		inapropriadamente fucosilados e sialilados
		Tecido conjuntivo
	Células D, T supressoras/citot, Células T helper, Macrófagos	Laminina
		Fibronectina
Células D,		
T supressoras/citot		
Imunoquímica	Ensaio de citotoxicidade	Células T helper
		Macrófagos
Cultura de tecidos	Função celular in vitro	Eficiência de clone
		Req. fator de cresc.
		Independ. ancoram.
		Transplante
Citometria de fluxo (citofluorometria)	Conteúdo do DNA	Aneupl. X Diploidia
		Índice de DNA
	Análise do ciclo celular	

JASS, J.R., Scand J Gastr Suppl 1988,149:21-36, 1988

TABELA 2 - Relação dos pacientes, segundo a média de vasos contados, gradação histológica, estadiamento tumoral, assim como características destes pacientes e as características da doença.

No. PAC.	MÉDIA VAS.	BRODERS	DUKES	SEXO/IDADE	LOCAL	TAMAN..
730453	13,1666667	G3	C	M 63	RETO	4X5 CM
730614	13,5833333	G2	B	M 50	ASCEND.	4 CM
731489	12	G3	C	F 55	ANG.HEPAT	6 CM
751057	19,8333333	G4	B	F 67	R-SIGMOIDE	5X5,5 CM
752030	17,1666667	G4	B	F 76	SIGMOIDE	6 CM
752401	17	G3	C	M 63	R-SIGMOIDE	7,5 CM
763095	18,25	G2	B	F 50	ANG.ESPL.	2,5 CM
764292	12,75	G4	C	F 66	CECO	4 CM
764660	24,1666667	G2	B	M 52	SIGMOIDE	4,8 CM
772020	23,1666667	G3	B	M 74	RETO	4,5X4 CM
772040	23,0833333	G2	B	F 70	R.SIGMOIDE	7X8 CM
772240	34,9166667	G4	B	F 77	ASCEND.	6 CM
772373	24,6666667	G4	B	M 80	RETO	6,5 CM
772525	11,5	G4	B	F 63	SIGMOIDE	4 CM
772568	17,25	G2	C	M 50	RETO	4 CM
772843	15,5833333	G4	B	F 65	RETO	3,5 CM
773768	17,75	G2	B	F 68	RETO	6X7 CM
780138	11,25	G3	B	M 57	RETO	3,8 CM
780147	28,9166667	G2	C	F 39	RETO	4 CM
780252	20,4166667	G4	B	M 70	TRANSV.	4 CM
780369	13,1666667	G4	B	M 51	CECO	7,5 CM
780539	18,1666667	G2	B	M 55	SIGMOIDE	2,5X2,5 CM
781252	14,75	G4	C	M 54	RETO	6,5 CM
781498	10,5833333	G4	B	M 67	RETO	3,8X3 CM
782563	14,6666667	G4	B	M 70	TRANSV.	4 CM
791350	17,9166667	G4	B	M 73	ASCEND.	3,5X5 CM
791889	21,75	G3	C	F 48	RETO	6,5 CM
792578	12,5	G4	B	F 46	RETO	1,8 CM
792672	7,4166667	G2	C	F 60	R.SIGMOIDE	6X5 CM
792825	14,6666667	G3	C	F 46	R.SIGMOIDE	3,6 CM
793651	15,0833333	G4	B	M 65	RETO	6 CM
793701	17	G2	B	F 60	RETO	5,7 CM
793914	14	G4	B	F 38	RETO	4,6 CM
810375	27,5	G1	C	F 51	RETO	8X5 CM
812945	12,5	G3	B	F 46	RETO	5X3,5 CM
823356	15,6666667	G4	C	M 43	RETO	8X6 CM
831588	17,0833333	G3	B	M 60	RETO	5 CM
832498	12,1666667	G4	C	F 66	ANG.HEPAT	5X4 CM
840543	10,5	G4	C	M 49	SIGMOIDE	13 CM
842024	11,4166667	G3	B	F 53	ASCEND.	4,5X3,5 CM
842267	13,8333333	G4	A	M 73	SIGMOIDE	5,7 CM
842372	10,5833333	G1	B	F 46	CECO	12
842944	13,4166667	G2	A	M 67	RETO	8,5X7 CM
881529	13,0833333	G2	B	M 54	ANG.HEPAT	7X4 CM
882758	11,6666667	G4	B	M 56	ASCEND.	7X5 CM
883856	11,4166667	G1	B	F 57	CECO	5X5 CM
944617	9,8333333	G2	B	M 61	SIGMOIDE	4,5 CM
950139	17,5	G3	B	M 54	SIGMOIDE	4,2 CM
951394	9,5833333	G3	C	F 72	TRANSV.	2,8X2,3 CM
951728	13,3333333	G2	A	M 66	DESCEND.	3,5 CM
951730	17,3333333	G2	A	F 56	R.SIMOIDE	2,5X2,5 CM
951731	10,25	G2	C	M 71	ASCEND.	4,5X3,2 CM
951944	14,0833333	G3	A	F 43	TRANSV.	3,4 CM
954130	16,4166667	G2	C	M 66	DESCEND.	3,5X3,5 CM
955559	15,5833333	G3	C	M 46	SIGMOIDE	3,5 CM

No. PAC.	1o.CAMPO	2o.CAMPO	3o.CAMPO	No.MÉDIO.	DUKES	BRODERS
751057	27	17	13	19,8333333	B	G4
	24	21	18			
	26	24	13			
	29	16	10			
752030	15	7	17	17,1666667	B	G4
	20	18	25			
	18	20	28			
752401	12	10	16	17	C	G3
	14	12	15			
	20	22	11			
763095	19	25	16	18,25	B	G2
	19	17	14			
	17	6	15			
772020	18	19	26	23,1666667	B	G3
	22	19	21			
	19	14	23			
	21	22	26			
840543	19	18	28	10,5	C	G4
	23	25	24			
	8	6	11			
	10	8	16			
881529	11	13	17	13,0833333	B	G2
	13	11	7			
	7	11	12			
	8	13	9			
772373	16	12	10	24,6666667	B	G4
	19	17	23			
	32	22	20			
	21	26	29			
772525	23	33	23	11,5	B	G4
	24	25	18			
	8	11	14			
	13	12	9			
944617	14	11	8	9,8333333	B	G2
	17	11	10			
	9	6	11			
	8	14	11			
842944	8	10	9	13,4166667	A	G2
	9	12	11			
	12	12	9			
	16	7	14			
	18	18	13			
	16	14	12			

TABELA 3.1 - Relação dos pacientes e os números de vasos que foram contados nos seus respectivos quadrantes dos campos microscópicos, a gradação histológica e o estadiamento tumoral.

No. PAC.	1o.CAMPO	2o.CAMPO	3o.CAMPO	No.MÉDIO.	DUKES	BRODERS
772568	13	20	12	17,25	C	G2
	20	26	15			
	12	27	13			
	15	22	12			
730614	12	12	8	13,5833333	B	G2
	16	19	14			
	15	18	9			
	16	14	10			
823356	13	12	6	15,6666667	C	G4
	14	16	8			
	26	13	22			
	20	17	21			
842024	9	7	12	11,4166667	B	G3
	11	9	12			
	12	16	12			
	11	17	9			
810375	21	19	21	27,5	C	G1
	39	29	34			
	23	41	18			
	34	30	21			
772843	19	12	15	15,5833333	B	G4
	14	13	16			
	16	17	15			
	16	21	13			
773768	20	18	19	17,75	B	G2
	7	16	13			
	20	21	13			
	24	22	20			
772240	46	23	26	34,9166667	B	G4
	54	34	24			
	47	28	25			
	46	40	26			
951944	14	19	6	14,0833333	A	G3
	22	14	6			
	25	12	6			
	17	16	12			
951730	8	25	20	17,3333333	A	G2
	20	15	21			
	15	18	17			
	6	19	24			
951731	15	14	12	10,25	C	G2
	8	9	5			
	17	5	6			
	21	6	5			
951728	15	11	11	13,3333333	A	G2
	12	11	11			
	13	14	12			
	20	15	15			

TABELA 3.2 - continuação da tabela 3.1

No. PAC.	1o.CAMPO	2o.CAMPO	3o.CAMPO	No.MÉDIO.	DUKES	BRODERS
955559	22	17	12	15,5833333	C	G3
	25	12	10			
	22	15	9			
	23	10	10			
950139	21	12	20	17,5	B	G3
	16	13	19			
	26	23	18			
	19	13	10			
882758	17	9	9	11,6666667	B	G4
	18	8	16			
	15	17	13			
	7	4	7			
883856	15	15	12	11,4166667	B	G1
	12	15	10			
	9	8	9			
	13	9	10			
761292	18	13	12	12,75	C	G4
	13	7	14			
	10	9	21			
	18	7	11			
780138	11	15	10	11,25	B	G3
	8	15	12			
	8	14	7			
	12	13	10			
780369	12	19	12	13,1666667	B	G4
	14	7	11			
	15	15	12			
	10	16	15			
780569	21	15	18	18,1666667	B	G2
	19	19	17			
	16	19	22			
	21	11	20			
781252	13	16	12	14,75	C	G4
	15	22	16			
	15	18	11			
	11	19	9			
781498	16	13	14	10,5833333	B	G4
	9	8	11			
	12	8	7			
	11	9	9			
782563	16	13	16	14,6666667	B	G4
	18	14	9			
	19	12	15			
	18	12	14			
812945	11	8	17	12,5	B	G3
	12	12	12			
	13	10	17			
	14	11	13			

TABELA 3.3 - continuação da tabela 3.2

No. PAC.	1o.CAMPO	2o.CAMPO	3o.CAMPO	No.MÉDIO.	DUKES	BRODERS
832498.	13	18	10	12,1666667	C	G4
	10	18	11			
	14	6	10			
	6	10	20			
730453	17	15	11	13,1666667	C	G3
	11	10	10			
	13	9	19			
951394	9	10	24	9,58333333	C	G3
	14	17	8			
	8	8	9			
	11	9	7			
842372	9	9	6	10,5833333	B	G1-G4
	11	13	9			
	10	5	10			
	12	7	20			
831588	11	7	12	17,0833333	B	G3
	19	15	16			
	20	14	17			
	19	18	16			
842267	18	18	15	13,8333333	A	G4
	20	8	20			
	13	7	16			
	7	14	14			
792672	15	18	14	7,41666667	C	G2
	10	9	9			
	11	10	7			
	4	7	8			
793914	1	6	7	14	B	G4
	20	13	11			
	11	13	16			
	10	17	12			
793701	18	17	10	17	B	G2
	22	15	12			
	18	16	19			
	24	20	8			
731489	19	14	17	12	C	G3
	19	16	6			
	11	9	13			
	15	10	10			
764660	14	14	7	24,1666667	B	G2
	21	25	21			
	24	28	27			
	30	20	24			
780147	29	24	17	28,9166667	C	G2
	33	32	30			
	31	30	17			
	30	27	26			
	24	34	33			

TABELA 3.4 - continuação da tabela 3.3

No. PAC.	1o.CAMPO	2o.CAMPO	3o.CAMPO	No.MÉDIO.	DUKES	BRODERS
791350	19	20	22	17,9166667	B	G4
	19	14	24			
	16	14	25			
	18	12	12			
791889	20	19	28	21,75	C	G3
	21	22	21			
	20	16	27			
	20	24	23			
792578	11	13	17	12,5	B	G4
	13	13	14			
	12	15	6			
	16	12	8			
792825	22	18	18	14,6666667	C	G3
	18	13	14			
	13	16	10			
	14	7	13			
793651	16	23	16	15,0833333	B	G4
	15	12	11			
	21	21	10			
	18	4	14			
954130	17	18	18	16,4166667	C	G2
	21	19	14			
	22	23	17			
	14	8	6			

TABELA 3.5 - continuação da tabela 3.4

ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES

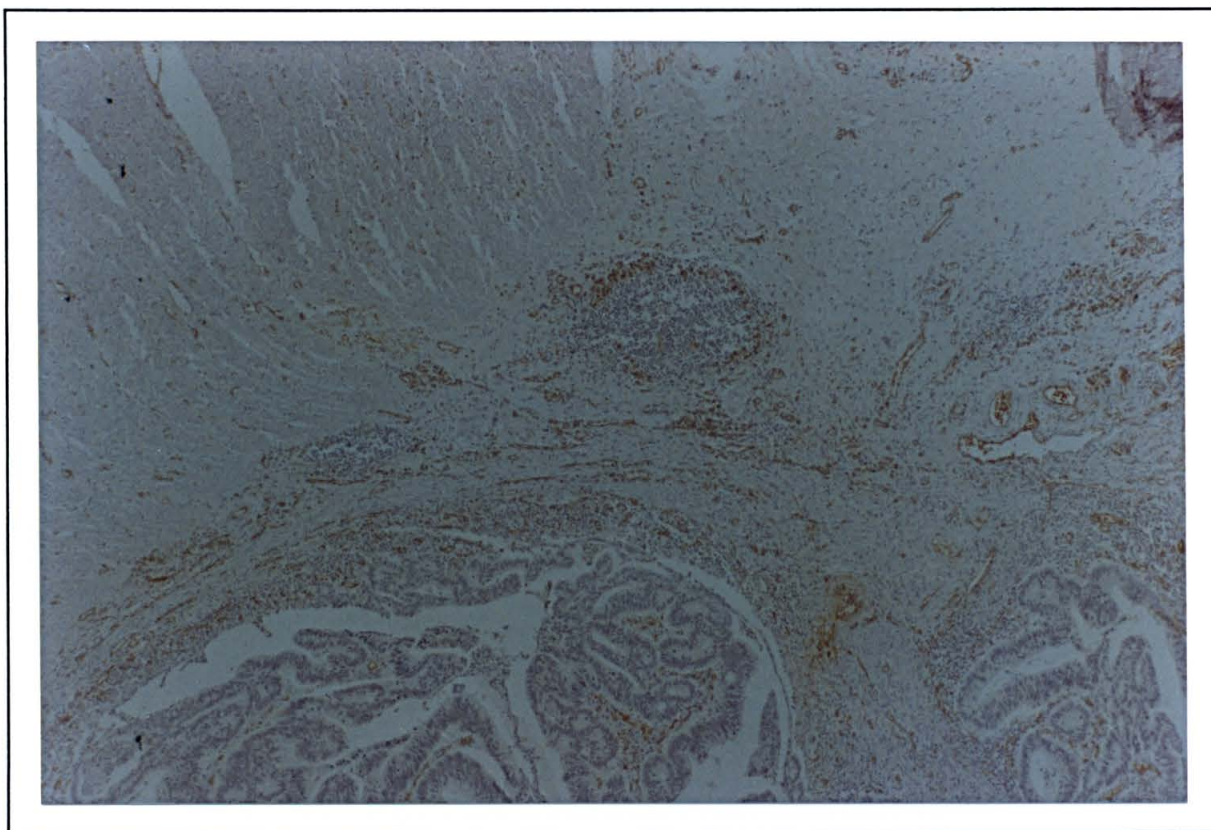


ILUSTRAÇÃO 1 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imunohistoquímica através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 40 aumentos: áreas coradas em marrom, indicando aglomerados de vasos sanguíneos, também denominados de "hotspots". Realiza-se a escolha de um desses locais para ser estudado no aumento de trabalho de 200X (paciente 772020).

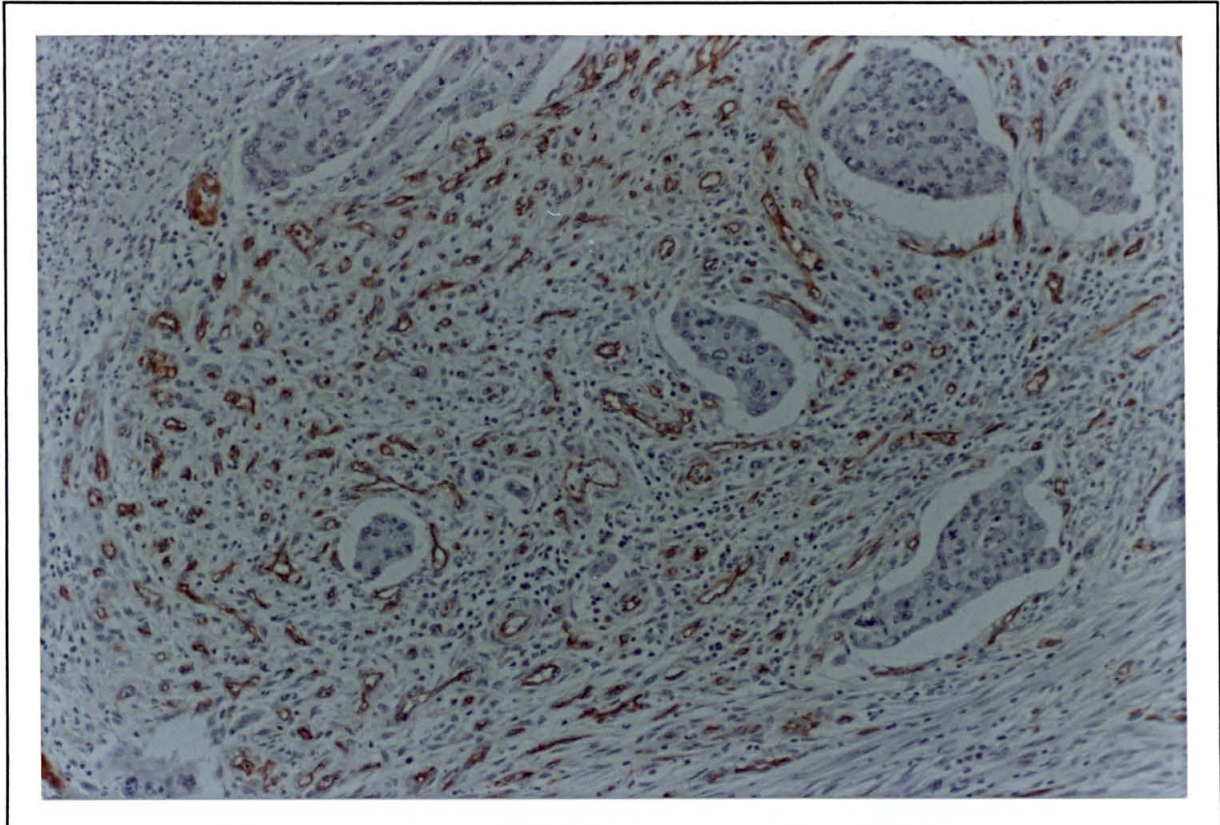


ILUSTRAÇÃO 2 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imunohistoquímica, através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 100 aumentos: um "hotspot" localizado num exame de pequeno aumento, agora visto com 100X e depois no aumento de trabalho de 200X. Já se pode demonstrar intensa angiogênese, vendo-se desde células endoteliais isoladas, vasos neoformados em abundância, até capilares maiores com embolos de células neoplásicas em seu interior (paciente 772020).

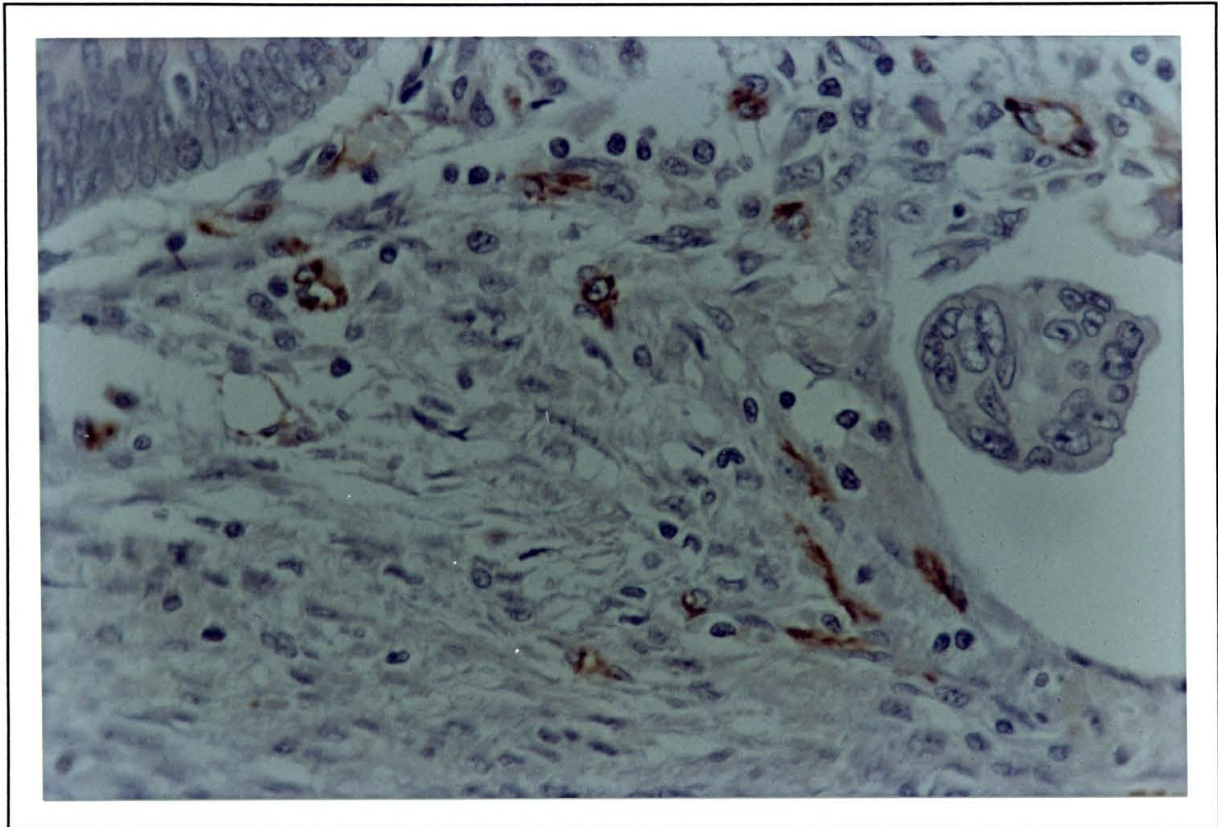


ILUSTRAÇÃO 3 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imunohistoquímica, através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 400 aumentos: células endoteliais isoladas, a partir das quais novos vasos serão formados (paciente 772020).

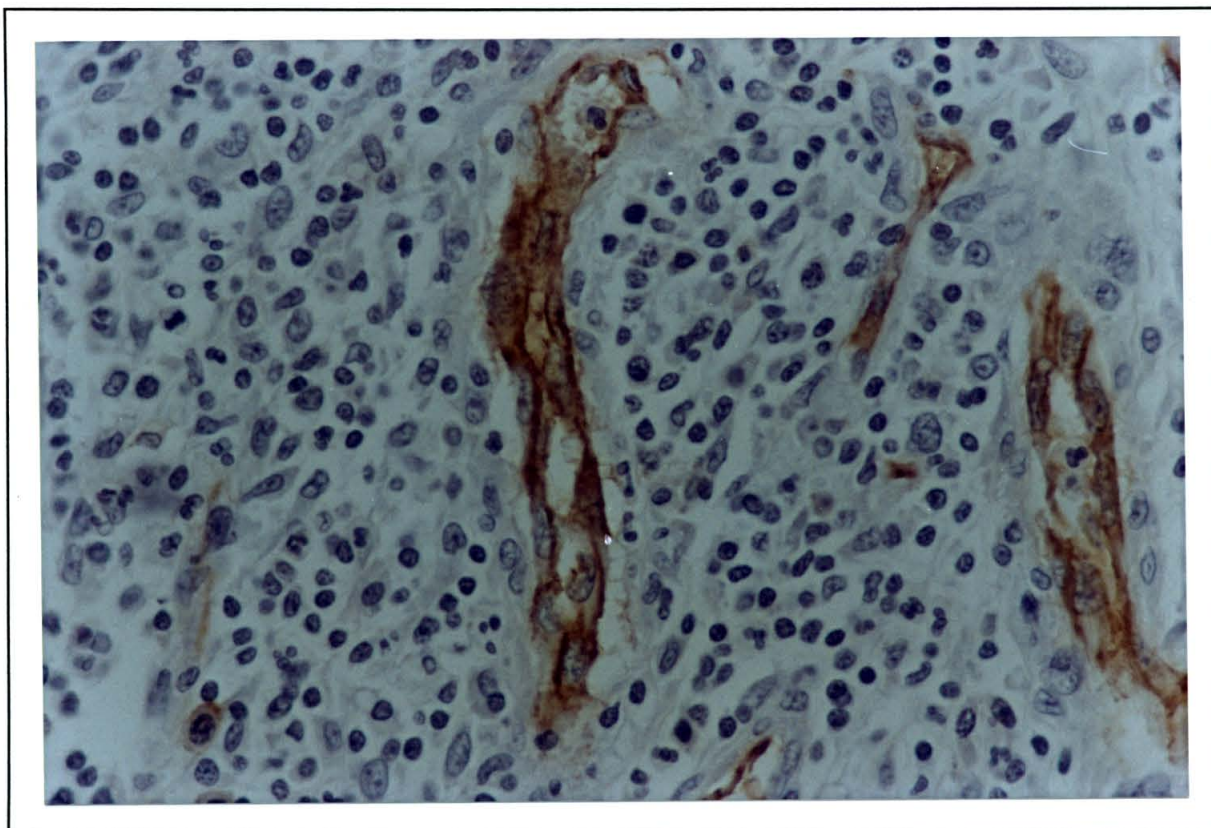


ILUSTRAÇÃO 4 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imunohistoquímica, através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 400 aumentos: vasos neoformados em meio de intenso infiltrado inflamatório crônico, linfoplasmocitário. Estas áreas não são recomendadas para contagem de vasos pois as células inflamatórias também estimulam a angiogênese (paciente 950139).

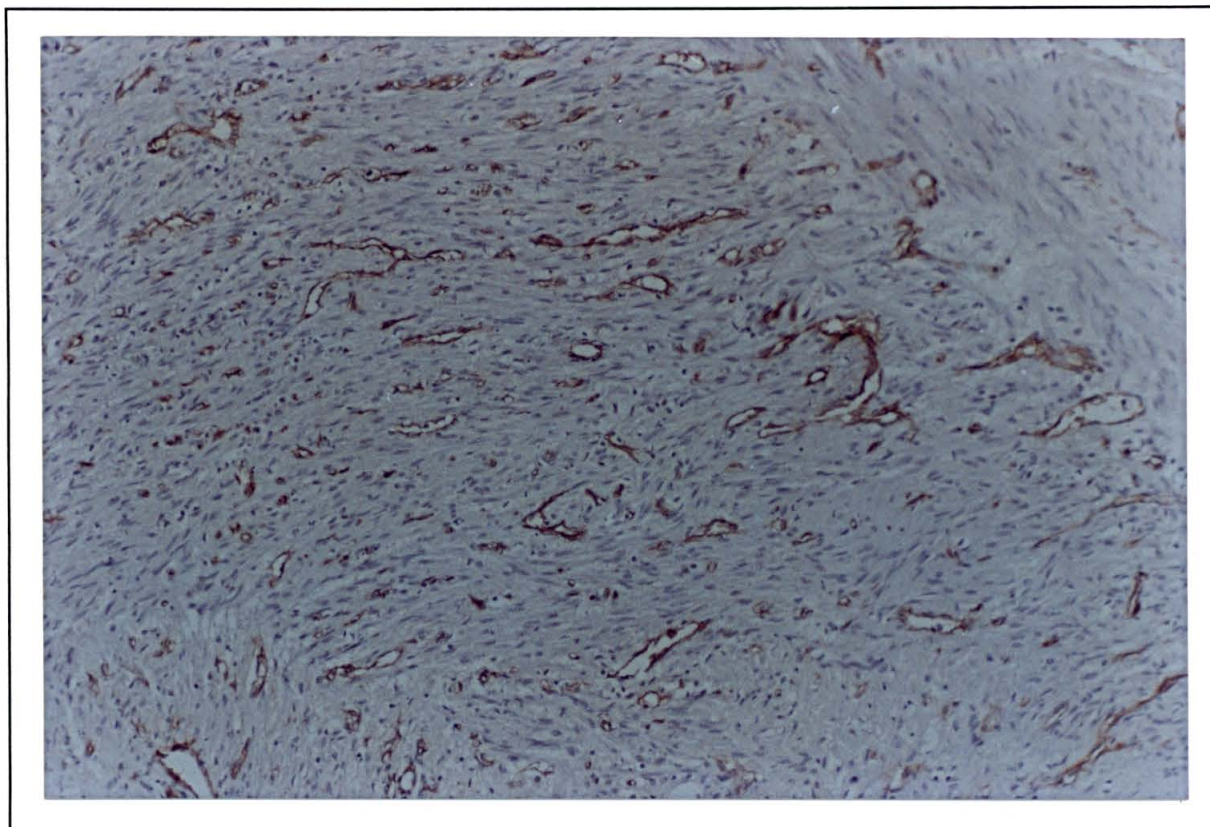


ILUSTRAÇÃO 5 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imunohistoquímica, através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 100 aumentos: angiogênese intensa e anormal junto a um vaso sanguíneo mais calibroso. Corresponde ao sítio dos vasa vasorum (paciente 780147).

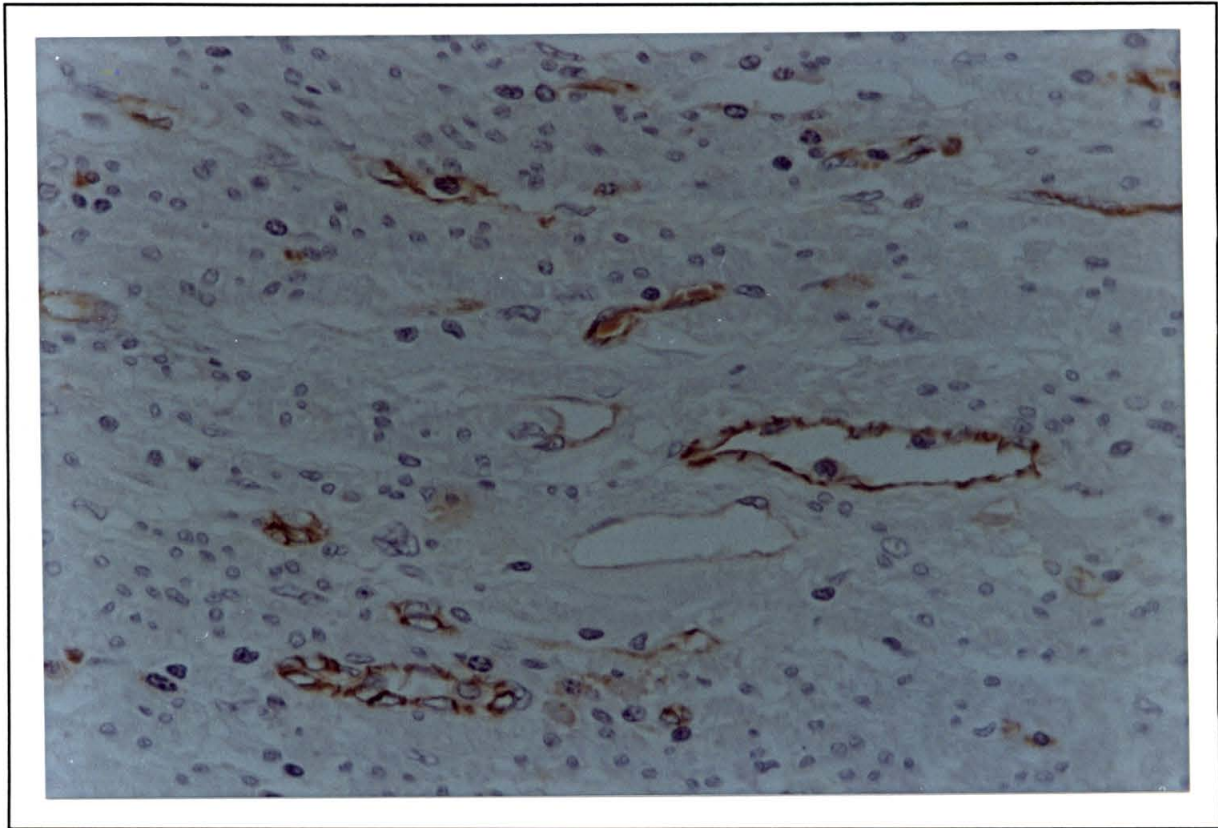


ILUSTRAÇÃO 6 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imunohistoquímica, através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 400 aumentos: tecido muscular adjacente a neoplasia, anormalmente rico em vasos sanguíneos neoformados quando comparado a ilustração 7 (paciente 780252).

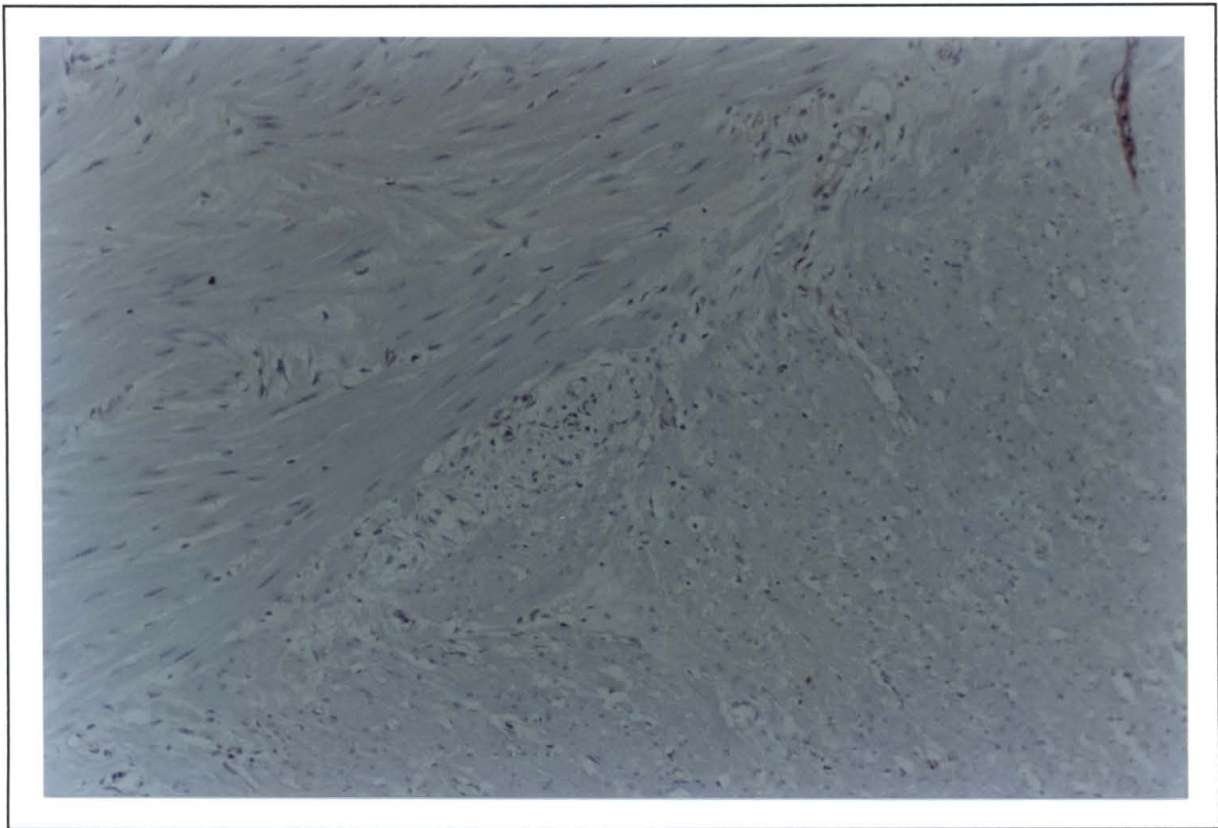


ILUSTRAÇÃO 7 - Fotomicrografia de lâmina histológica de adenocarcinoma col-retal corada por técnica imuno-histomquímica, através da imunoperoxidase, ligada a anticorpo monoclonal DAKO - CD31 JC/70A para membrana de células endoteliais, demonstrando em 100 aumentos: tecido muscular distante da neoplasia, normalmente pobre em vasos sanguíneos (paciente 780252).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. A avaliação da angiogênese em adenocarcinoma de cólons e reto não se comporta da mesma maneira como no câncer de mama, de próstata e de pulmão

2. A avaliação da angiogênese em adenocarcinoma de cólons e reto não apresentou nenhum valor prognóstico, quando comparado com o grau de diferenciação histológica, segundo a classificação de Broders

3. A avaliação da angiogênese em adenocarcinoma de cólons e reto não apresentou nenhum valor prognóstico, quando comparado com o estadiamento tumoral, estabelecido pela classificação de Dukes

4. Há indícios de que o comportamento biológico da neoformação vascular tumoral no adenocarcinoma colo-retal seja diferente do de vísceras sólidas, como o carcinoma mamário, prostático ou pulmonar.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

Capítulo 08

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACCHI, C.E. Angiogênese tumoral: uma nova área de atuação para o patologista. Editorial, **Jornal do Anatomopatologista**, Órgão Oficial da ASSOCIAÇÃO DOS PATOLOGISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, Ano 9, No.2, 1994

BATTIFORA, H. Epithelioid hemangio endothelioma imitating mesothelioma. **Appl Immunohistochem**, 1993 1:220-2

BEART, R. W.; HEERDEN, J.A.; BEARS, O.H. Evolution in the pathologic staging of carcinoma of the colon. **SG&O**, 146:257-78, 1978

BOSARI, S.; LEE, A.K.; DELELLIS, R.A.; ET ALLI. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. **Hum Pathol**, 23:755-761, 1992.

BOURNE, J.A. **Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods, Imunochemistry Laboratory**, Ed. DAKO Corporation, Santa Barbara, Ca, 1993

BREM, S.; COTRAN, R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. **J Nat Cancer Inst** 48: 347-356, 1972

CUTAIT, R.; ALVES, V. A. F.; CÂMARA-LOPES, L. H. A.; ET ALLI. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastasis through immunoperoxidase staining of CEA and Cytokeratins. **Dis Colon Rectum**, 34:917-20, 1991

DAKO. Monoclonal mouse anti-human endothelial cell, CD31 , **Specification Sheet (DAKO-CD31-JC/70A)** Code No. M823 LotNo. 110, M823/JA/05.05.92

- DAVIS, N.C.; NEWLAND, R.C. Terminology and classification of colorectal adenocarcinoma; the Australian clinico-pathological staging system. **Aust N S J Surg**, 53:211-21, 1983
- DE YOUNG, B.R.; FITZGIBBON, J.F.; SWANSON, P.E. CD31 An immunospecific marker for endothelial differentiation in human neoplasms. **Appl Immunohistochem**, 1:97-100, 1993
- FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, 235: 442-447, 1987
- FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ABERNATHY, C.; ET AL. Isolation of a Factor Responsible for Tumor Angiogenesis. **J Exptl Med**, 133: 275-288, 1971
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. **N Engl J Med**, 285:1182-1186, 1971
- FOLKMAN, J. Relation fo vascular proliferation to tumor growth. **Int Rev Exp Pathol**; 16:207-248, 1976
- FOLKMAN, J.; WATSON, K.; INGBER, D.; ET AL. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, 339 58-61, 1989
- FOLKMAN, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? **J Natl Cancer Inst**, 82:4-6, 1990
- GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. Patologia molecular do aparelho digestivo, In: MALAFAIA, O.; MARCHESINI, J.B.; LEITÃO, O.R.; ET ALLI. **A Gastroenterologia Hoje e Amanhã: Temas de Atualização do Curso Pré-Congresso**, Ed. XXXIII Congresso Brasileiro de Gastroenterologia, 1994, pp 59-70
- GIMBRONE, M.A.; LEAPMAN, S.B.; COTRAN, R.S.; ET AL. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. **J Exp Med**, 136:261-276, 1972
- GIMBRONE, M.A.; COTRAN, R.S.; LEAPMAN, S.B.; ET AL. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. **J Natl Cancer Inst**, 52:413-27, 1974

- GIMBRONE, M.A.; GIULLINO, P.M., Angiogenetic capacity of preneoplastic lesions of the murine mammary gland as a marker of neoplastic transformation. **Cancer Res**, 36: 2611-2620, 1976
- HALVORSEN, T.B.; SEIM, E. Degree of differentiation in colorectal adenocarcinoma: a multivariate analysis of the influence in survival. **J Clin Pathol**, 41:532-7, 1988
- HARRISON, J.C.; DEAN, P.J.; EL-ZEKI, F.; ET AL. From Dukes through Jass: Pathological prognostic indicators in rectal cancer. **Human Pathology**, 25:498-505, 1994
- HART, I.R.; SAINI, A. Biology of tumours metastasis. **Lancet**, 339: 1453-57, 1992
- HENRICHSEN, S.; CHRISTIANSEN, J. Prognostic staging of extraperitoneal rectal cancer. **Dis Colon & Rectum**, 32:214-8, 1989
- HERMANEK, P.; SOBIN, L.H. UICC International Union Against Cancer. **TNM Classification of Malignant Tumours**, Springer-Verlag, Berlin, 4th Edition, 1987, p9
- HORAK, E.R.; LEEK, R.; KLENK,.; ET ALLI. Angiogenesis, assessed by platelet / endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. **Lancet**, 340:1120-1124, 1992
- INGBER, D.; FUJITA, T.; KISHIMOTO, S.; ET ALLI. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. **Nature**, 348:555-557, 1990
- JASS, J.R., The pathological grading and staging of rectal cancer. **Scand J Gastr**, Suppl, 149:21-36, 1988
- LEE, A.C.L.; DELELLIS, R.A.; SILVERMAN, M.L.; ET AL. Perspectives in pathology: Lymphatic and blood vessel invasion in breast carcinoma: a useful prognostic indicator? **Hum Pathol**, 17:984-987, 1986

- LIOTTA, L.A.; KLEINERMAN, J.; AND SAIDEL, G.M. Quantitative relationship of Intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. **Cancer Res**, 34:997-1004, 1974
- LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STETLER-STEVENSON, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, 64:327-336, 1991
- MACCHIARINI, P.; FONTANINI, G.; HARDIN, M.J.; ET ALI. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. **Lancet**, 340:145-146, 1992
- MAHADEVAN, V.; HART, I.R., Metastasis and angiogenesis. **Acta Oncol**; 29:97-103, 1990
- MLYNEK, M.L.; VAN BEUNINGER, D.; LEDER, L.D.; ET AL. Measurement of the grade of vascularization in histological tumour tissue sections. **Br J Cancer**; 52:945-948, 1985
- MORSON, B.C.; DAWSON, I.M.P.; DAY, D.W.; ET AL. **Morson & Dawson's Gastrointestinal Pathology**. 3rd. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 608-21, 1990
- PARUMS, D.V.; CORDELL, J.L.; MICKLEM, K.; ET AL. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. **J Clin Pathol**; 43:752-57, 1990
- SMOLLE, J.; SOYER, H.-P.; HOFMANN-WELLENHOF, R.; ET AL. Vascular architecture of melanocytic skin tumours. **Pathol Res Pract**; 185:740-745, 1989
- SRIVASTAVA, A.; LAIDLER, P.; DAVIES, R.P.; ET AL. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76 - 4.0 mm thick) skin melanoma: a quantitative histologic study. **Am J Pathol**, 133:419-423, 1988
- TUAN, D.; SMITH, S.; FOLKMAN, J.; ET AL. Isolation of the nonhistone proteins of rat Walker carcinoma 256: Their association with tumor angiogenesis. **Biochemistry**, 12:3159-3165, 1973

- WAKUI, S.; FURUSATO, M.; ITOH, T.; ET ALI. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. **J Pathol**, 168:257-262, 1992
- WEIDNER, N.; FOLKMAN, J.; POZZA, F.; ET AL. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early - stage breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, 84:1875-87, 1992
- WEIDNER, N.; SEMPLE, J.P.; WELCH, W.R.; ET AL. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast prostate carcinoma. **Am J Pathol**, 143:401-9, 1993
- ZERBINI, M.C.N.; GAYOTTO, LC.C., Citometria de DNA- Aplicações na Área da Gastroenterologia. In MALAFAIA, O.; MARCHESINI, J.B.; LEITÃO, O.R.; ET ALI. **A Gastroenterologia Hoje e Amanhã: Temas de Atualização do Curso Pré-Congresso**, Ed. XXXIII Congresso Brasileiro de Gastroenterologia, 1994, pp 71-9

ANEXO- ESTATÍSTICA

Capítulo 09

ANEXO - ESTATÍSTICA

STATISTICA: BASIC STATISTICS

STAT. GENERAL MANOVA			Standard Deviations (angiolab.sta) 1 Dependent Variable		
BRODERS	MEDVAS	Valid N			
G3	3.951172	14			
G2	5.424744	17			
G4	5.608749	21			
G1	9.535387	3			
All Groups	5.271506	55			

STAT. GENERAL MANOVA			Means (angiolab.sta) 1 Dependent Variable		
BRODERS	MEDVAS	Valid N			
G3	15.05357	14			
G2	16.42647	17			
G4	15.87302	21			
G1	16.50000	3			
All Groups	15.86970	55			

STAT. GENERAL MANOVA						MAIN EFFECT: BRODERS (angiolab.sta) 1-BRODERS					
Univar. Test	Type III SS	df	Type III MS	F	p-level						
Effect	15.787	3	5.26229	.180749	.908984						
Error	1484.807	51	29.11386								

STAT. GENERAL MANOVA						MAIN EFFECT: DUKES (angiolab.sta) 1-DUKES					
Univar. Test	Type III SS	df	Type III MS	F	p-level						
Effect	22.320	2	11.15998	.392565	.677307						
Error	1478.274	52	28.42835								

STATISTICA: BASIC STATISTICS

STAT. GENERAL MANOVA	Means (angiolab.sta) 1 Dependent Variable	
DUKES	MEDVAS	Valid N
C	15.40741	18
B	16.35938	32
A	14.40000	5
All Groups	15.86970	55

STAT. GENERAL MANOVA	Standard Deviations (angiolab.sta) 1 Dependent Variable	
DUKES	MEDVAS	Valid N
C	5.737582	18
B	5.410581	32
A	1.668124	5
All Groups	5.271506	55