
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO FATOR TECIDUAL (TF)
NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL
POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
EM TEMPO REAL (RT – PCR)**

NORLAI ALVES AZEVEDO

**Área de Concentração: Clínica Médica
Orientador: Vinicius Duval da Silva
Co-orientador: Eraldo Batista Junior**

Porto Alegre, junho de 2010

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO FATOR TECIDUAL (FT) NO
ADENOCARCINOMA COLORRETAL
POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
EM TEMPO REAL (RT – PCR)**

NORLAI ALVES AZEVEDO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul, para a obtenção do título de Doutor
em Medicina e Ciências da Saúde – Área de
Concentração: Clínica Médica.

Porto Alegre, junho de 2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

A994e Azevedo, Norlai Alves

Expressão diferencial do fator tecidual (FT) no adenoma colorretal por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT – PCR) / Norlai Alves Azevedo. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

108 f.: il. tab.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Eraldo Batista Junior.

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

1 FATOR TECIDUAL. 2. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 3. ADENOCARCINOMA. 4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 5. HUMANOS. 6. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Silva, Vinicius Duval da. II. Batista Junior, Eraldo. III. Título.

C.D.D. 616.99435
C.D.U. 616.34-006(043.2)
N.L.M. WI 529

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

DOUTORANDA: NORLAI ALVES AZEVEDO

ENDEREÇO: RUA SANTOS DUMONT 521 AP 203 CEP 96020-380

PELOTAS – RS

E MAIL: norlai@terra.com.br

TELEFONE: (53) 30 28 38 18 - (53) 91455120

COREN: 053736

ÓRGÃO FINANCIADOR: CNPq Edital/chamada: MCT/CNPq 15/2007.

Universal – Faixa B

“Não deixe que a saudade sufoque que a rotina acomode que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morra esteja vivo, quem quase vive já morreu”.

Luis Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Dr. Vinicius Duval da Silva por ter acreditado no meu potencial, e confiado a mim parte de seu trabalho, fruto do grande pesquisador e profissional que é; com a calma e a paciência que lhe é peculiar, foi me mostrando o caminho passo a passo, diminuindo assim a minha ansiedade e contribuindo para o meu aprendizado.

Ao meu co-orientador Eraldo Batista Junior pela sua incansável ajuda e dedicação, com a sua capacidade intelectual e o rigor da exigência, foi um exemplo a ser seguido e me instigou a querer saber mais sobre medicina molecular e seus métodos de pesquisa.

Ao meu esposo Luis Carlos e ao meu filho Carril, que souberam entender minhas ausências, queixas e preocupações e esperaram pacientes que mais esta etapa fosse concluída.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, sem ele nada disso teria sido possível.

Ao programa de Pós- graduação em Medicina e Ciências da Saúde/ Clínica Médica da PUCRS, por ter me proporcionado a realização do doutorado, e o privilégio de ter feito parte de um curso de qualidade e excelente formação.

A Pró- reitoria de pesquisa e Pós-graduação da PUCRS, na pessoa do Pró-reitor Prof. Jorge Luis Audy através de seu empenho me foi permitido continuar e concluir o curso de doutorado.

A Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Pelotas, FEN/UFPel, principalmente aos meus colegas de Departamento pela liberação para cursar o doutorado, assumindo minhas atividades no período em que estive afastada.

A Luciane Prado Kantorski, diretora da FEN/UFPel, pelo incentivo, e por ter se mostrado uma amiga sempre presente.

Ao Tiago Giuliane, excelente profissional e técnico do laboratório de patologia, pela ajuda na coleta de dados, durante o preparo e extração de RNAs das amostras.

Aos meus colegas da turma de pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde/Clínica Médica 2007/1, pelo companheirismo durante toda esta caminhada e dos tantos momentos nos quais falávamos de nossos sonhos e pretensões a pesquisadores.

A minha colega de turma e amiga querida, Carla Costa Moreira, pelo apoio e as dicas sobre medicina molecular, e o companheirismo que demonstrou nas horas em que mais necessitei.

A minha amiga Ana Claudia colega de doutorado e de trabalho pelo apoio e incentivo, e por não me deixar esquecer que tudo no final daria certo. Obrigada

Ao Laboratório de patologia da PUCRS, por ter me cedido o material para esta pesquisa e a seus funcionários sempre dispostos a ajudar.

Ao prof. Dr. Diogenes Santiago dos Santos pela possibilidade de uso de suas instalações no CPBMF/TecnoPUC

Ao Dr. Lúcio Fillmann pelas sugestões e críticas e por ter cedido seu material para que eu pudesse realizar esta pesquisa.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, pelo profissionalismo e respeito pelos pós-graduandos.

Aos meus familiares que incentivaram meus sonhos e sempre acreditaram em mim, especialmente ao meu irmão Anderson, meu grande amigo, pela presença e o incentivo durante esta caminhada.

A todas as pessoas que contribuíram de uma forma ou de outra para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Epidemiologia do câncer do câncer colorretal.....	21
2.2 Avaliação clínica e anátomo-patológica dos tumores colorretais: dados relevantes para o prognóstico.....	23
2.3 Angiogênese tumoral: fisiopatologia e importância clínico-patológica.....	333
2.4 Fator tecidual: funções fisiológicas e importância no desenvolvimento de neoplasias malignas.....	44
4	
3 OBJETIVOS.....	59
3.1 Geral.....	59
3.2 Específicos.....	59
4 METODOLOGIA.....	60
4.1 Delineamento do estudo.....	60
4.2 Local do estudo	60

4.3 Seleção da amostra.....	60
4.4 Critérios de inclusão.....	61
4.5 Critérios de exclusão.....	61
4.6 Critérios de exclusão de controles.....	62
4.7 Variáveis do estudo.....	62
4.8 Material e Método.....	63
4.8.1 Purificação do RNA total.....	64
4.8.2 Transcrição Reversa.....	666
4.8.3 PCR quantitativo baseado em fluorescência.....	677
4.9 Análise estatística.....	71
4.10 Aspectos bioéticos da pesquisa.....	71
5 RESULTADOS.....	73
5.1 Caracterização da amostra estudada.....	73
5.2 Expressão diferencial do Fator Tecidual.....	75
5.3 Relação da expressão do Fator Tecidual com o grau de Densidade microvascular..	76
5.4 Relação da expressão do Fator Tecidual com a presença de metástase.....	76
6 DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÕES.....	88

PERSPECTIVAS DE NOVOS ESTUDOS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXO 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	107
ANEXO 2 - Artigo Original.....	108

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - Estadiamento TNM (AJCC) para o câncer colorretal e correlação com a classificação de Dukes	26
Tabela 1 - Caracterização da amostra	75
Tabela 2 - Distribuição da amostra quanto à expressão do Fator Tecidual e Densidade Microvascular por grupo em estudo	75
Tabela 3 - Avaliação da expressão do Fator Tecidual e Densidade micro vascular conforme sexo, localização do tumor e metástase no grupo de pacientes.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da cascata de coagulação sanguínea.....	45
Figura 2- Análise quantitativa da expressão diferencial de genes baseada em fluorescência	68
Figura 3- Processamento e análise das amostras	70
Figura 4 - Avaliação da expressão média com o intervalo de 95% de confiança conforme grupo em estudo	76
Figura 5 - Associação entre a expressão Tecidual e a densidade microvascular nos pacientes com tumor	77
Figura 6 - Associação entre a Expressão do Fator Tecidual e a idade nos pacientes	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CA	Câncer
cDNA	Ácido desoxirribonucléico
CP-BMF (TECNOPUC)	Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional
DMV	Densidade microvascular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FGF2	Fator 2 de crescimento dos fibroblastos
FVIIa	Fator sete ativado
FXa	Fator X ativado
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase humana
IGF – 1	insulina tipo 1 insulin – livre growth factor - 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
PARs	Receptores da ativação da protease
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RT/PCR	Reação de Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TF	Fator Tecidual
TGF	Fator de crescimento de transformação
TNM	Tumor Nódulo Mestástase
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

O adenocarcinoma colorretal é uma das neoplasias mais incidentes no ser humano. A expressão do Fator Tecidual (FT) foi associada ao desenvolvimento de metástases e a um pior prognóstico em várias neoplasias malignas, sendo considerado um dos mais importantes fatores pró-angiogênicos. Este estudo teve como objetivo principal demonstrar a expressão diferencial do FT em adenocarcinomas colorretais através da técnica de quantificação de ácidos nucleicos (mRNA) por Reação de Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). Foram estudados blocos de parafina de 19 pacientes com tumor (casos) e 15 sem tumor (controles) do banco de dados, do Serviço de Colo-proctologia do Hospital São Lucas da PUCRS. A intensidade da expressão do FT foi comparada com a DMV e com dados clínicos e anatomo-patológicos. O grupo tumor apresentou expressão do FT maior do que o grupo controle ($p < 0,001$), e teve uma expressão do FT em média 7,33 vezes maior do que o grupo controle. Houve associação significativa entre a presença de metástase e a expressão aumentada do FT ($p = 0,001$), bem como entre a idade e a expressão do FT nos pacientes com tumor ($p = 0,026$); entretanto, não foi encontrada associação entre a expressão do Fator Tecidual e a Densidade microvascular, ($p = 0,67$), e em relação a localização dos tumores e sexo dos pacientes. Em conclusão, a expressão diferencial do FT do grupo tumor foi significativamente mais alta do que no grupo controle. Apresentou ainda uma associação positiva com a idade mais elevada dos pacientes e com a presença de metástases.

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the neoplasias with higher incidence in humans. TF expression has been associated with development of metastasis and poor prognosis in many types of tumors, and it is considered one of the most important pro-angiogenic factors. This study aimed to demonstrate the differential of TF expression in colorectal carcinomas, by using the technique of quantification of nucleic acids (mRNA) by Polymerase Chain Reaction in Real Time (RT-PCR). Paraffin Blocks were studied in 19 patients with tumors (cases) and 15 without tumors (control) in the database of the Department of Colo-Proctology, at the São Lucas Hospital of PUCRS, and the intensity of TF expression was compared with the microvascular density DMV and with clinical and pathological findings. The tumor group presented a TF expression greater than that of the control group ($p < 0.001$), and it had a TF expression which, on average, was 7.33 times higher than the control group. There was a significant association between the presence of metastasis and increased TF expression ($p = 0.001$), as well as between age and TF expression in patients with tumors ($p = 0.026$); however, we found no association between the expression of tissue factor and DMV ($p = 0.67$) related to the location of tumors and sex of the patients. In conclusion, the differential expression of tissue factor in the tumor group was significantly higher than in the control group, and it also presented a positive association with older age of patients and the presence of metastases.

1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma colorretal é o tumor maligno que mais acomete o intestino grosso e o reto. Ocorre em elevada percentagem e constitui a segunda causa mais comum de morte no mundo ocidental.¹

Em termos de incidência, o câncer de cólon e reto configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos.

Cerca de 9,4% de todos os cânceres, equivalendo a um milhão de casos novos, são de cólon e reto. Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres; porém, o câncer de reto é cerca de 20% a 50% maior em homens na maioria das populações.^{2,3}

No Brasil, os carcinomas colorretais estão entre as cinco neoplasias malignas mais frequentes.³ Segundo o Instituto Nacional do Câncer,⁴ os números projetados para o ano de 2010 apontam uma taxa de incidência de 13.310 novos casos, ou seja, 13,73 novos casos /100.000 indivíduos/ano entre homens e de 14.800 novos casos 14,80/100.000 indivíduos/ano entre mulheres. No Rio Grande do Sul, as estimativas projetadas indicam uma incidência significativamente mais elevada, com 3.010 novos casos, 21,27 /100.000 indivíduos/ano entre homens e 3.140 novos casos (21,66 /100.000) indivíduos/ano entre mulheres.

Em Porto Alegre, estas cifras são ainda mais significativas com 600 novos casos, 33,93 /100.000 indivíduos /ano entre homens e 680 novos casos, 34,73 /100.000 indivíduos /ano entre mulheres.

Vários autores têm buscado na biologia molecular a identificação de fatores prognósticos mais efetivos para a elucidação de diversos tipos de tumores, envolvendo fator tecidual (FT) e angiogênese, através da utilização da técnica de quantificação por imunistoquímica. Entre eles podemos citar: Maahs⁵, Dornelles⁶, Maciel⁷, Fillmann⁸, Toneto⁹.

O FT é uma proteína de membrana celular ligada ao desencadeamento da cascata da coagulação e, parece ser fundamental para a progressão das neoplasias malignas, através da ativação do processo de angiogênese,^{8,9} sendo considerado um dos mais importantes fatores pró-angiogênicos.¹⁰

A angiogênese constitui o processo de formação de novos vasos; portanto, se faz necessária para o crescimento, invasão e metástase de tumores sólidos.¹⁰

A expressão do FT foi associada ao desenvolvimento de metástases e a um pior prognóstico em vários tipos tumorais,⁷ como demonstrado inicialmente em sarcomas e posteriormente em carcinomas de próstata,^{11, 12, 13} de cólon,⁸ estômago,⁹ pulmão do tipo não pequenas células,¹⁴ pâncreas,¹⁵ e melanomas.¹⁶

Aparentemente, a expressão do TF possibilita um aumento da taxa de crescimento tumoral e da neovascularização mediada parcialmente pela produção concomitante do VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular) e pela redução da trombospondina 2.^{11,17}

Resultados preliminares em nosso laboratório evidenciaram a expressão de fator tecidual em adenocarcinomas colo-retais estudados, utilizando técnica de imunistoquímica. Justifica-se assim a continuidade do estudo com a avaliação quantitativa da expressão de mRNA de FT nas amostras.

A demonstração da expressão do objeto de estudo por outro método além da imunistoquímica é altamente recomendada pelos editores das revistas de maior impacto na literatura médica atual, como o *Journal of Pathology*, um exemplo da área de anatomia patológica com fator ISI acima de sete.

A necessidade de aperfeiçoar laboratórios de anatomia patológica universitários para a era da patologia molecular é, em nossa opinião, uma das formas mais eficazes de aproximar a pesquisa brasileira da vanguarda mundial e, ao mesmo tempo, tornar tais técnicas viáveis no atendimento aos pacientes. As características e a riqueza de material dos serviços de patologia reforçam tais possibilidades.

Em nosso laboratório, além do adenocarcinoma colo-retal, estudos de expressão de fator tecidual e angiogênese tumoral estão sendo realizados em carcinoma urotelial, adenocarcinoma gástrico, cabeça e pescoço e tumor de Wilms, envolvendo alunos de pós-graduação e bolsistas de iniciação científica.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos envolvendo biologia molecular utilizando o método de Reação de cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Chung¹⁸ investigou a síntese das moléculas em células de câncer colorretal durante a hipóxia para explorar a possibilidade de detectar células mortas e/ ou a eficiência da radioterapia e quimioterapia.

Chen¹⁹ utilizou as técnicas de RT-PCR e imunistoquímica, para determinar a associação entre a super expressão da proteína TSPAN1 com a clínica patológica e, com fatores prognósticos em adenocarcinoma colorretal humano. Sundlisaeter e colaboradores¹ utilizaram RT- PCR para determinar a expressão de (FGF-2) Fator 2 de Crescimento dos Fibroblastos.^{20,21,22,23}

Porém, até o presente momento, não se tem informações a respeito de nenhum outro estudo, envolvendo a quantificação da expressão do Fator Tecidual no adenocarcinoma colorretal, utilizando a técnica de quantificação de mRNA por RT-PCR, objeto de nosso estudo.

Considerando à frequência e a intensidade da expressão do FT no adenocarcinoma colorretal, abrem-se inúmeras perspectivas de estudo tanto na avaliação da fisiopatologia da progressão dos tumores em combinação com a cascata da coagulação, como na possibilidade de novas abordagens terapêuticas.

O presente estudo pretende demonstrar a expressão diferencial do fator tecidual (Tissue Factor, ou TF) no adenocarcinoma colo-retal, utilizando técnica de quantificação de mRNA por Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), para avaliação da proteína fator tecidual, e verificar a possível relação do FT com a angiogênese e com características anátomo patológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal é uma neoplasia maligna que afeta o intestino grosso e/ou o reto, acometendo a parede intestinal e que, dependendo do grau de invasão desta, pode comprometer outros órgãos, quer diretamente, quer através de metástases.

Este tipo de câncer é um dos mais frequentes e, em geral, está relacionado ao sedentarismo, obesidade, tabagismo, história familiar de câncer colorretal, predisposição genética, à dieta rica em carnes vermelhas e, possivelmente, à dieta pobre em fibras.^{3,24,25}

Este tipo de câncer abrange tumores em todo o cólon, reto e apêndice. Aproximadamente 655 mil pessoas por ano morrem por causa deste tipo de câncer, sendo a terceira forma de câncer mais comum e a segunda maior causa de morte no mundo ocidental.²⁵ Estima-se que em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento.³

Acredita-se que muitos tumores originam-se de pólipos adenomatosos de cólon. Tais pólipos são neoplasias benignas, mas podem, com o tempo, sofrer transformações malignas.²⁵

Ao comparar a incidência de câncer de cólon direito em relação a todas as outras localizações de câncer colorretais,

Tomislaw e colaboradores²⁶ chegaram a conclusão que a incidência de câncer de cólon e reto foram consistentemente aumentando. Por outro lado, a incidência e mortalidade por câncer de cólon teve um declínio ao longo dos últimos 20 anos nos Estados Unidos. Porém, manteve-se como a terceira causa de mortalidade relacionada com câncer em 2008.²⁷

No Brasil, com o aumento da expectativa de vida associado à progressiva industrialização, observa-se que os tumores malignos, de uma maneira geral, crescem em importância, ocupando, progressivamente, posições mais altas no perfil epidemiológico de incidência e de mortalidade geral da população.²⁴ Este é o caso do câncer de intestino grosso e reto.

Entre os brasileiros, os carcinomas colorretais estão entre as cinco neoplasias malignas mais frequentes.²⁵ Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA),⁴ os números projetados para o ano de 2010 apontavam uma taxa de incidência no Brasil de 12.490 novos casos, ou seja, 13 novos casos /100.000 indivíduos/ano entre homens e 14.500 novos casos 15/100.000 indivíduos/ano entre mulheres.

No Rio Grande do Sul, as taxas projetadas pelo INCA indicam uma incidência significativamente mais elevada, com 2.850 novos casos, 20,6 /100.000 indivíduos/ano entre homens e 3.100 novos casos 21,9 /100.000 indivíduos/ano entre mulheres.

Em Porto Alegre estas cifras são ainda mais significativas com 580 novos casos, 33,21 /100.000 indivíduos /ano entre homens e 650 novos casos, 34,13 /100.000 indivíduos /ano entre mulheres, no ano de 2010.²⁵

As regiões Sul e Sudeste, em comparação com as demais, apresentam hábitos de vida que poderiam se associar mais facilmente a um risco elevado de desenvolvimento do câncer colo-retal, como o baixo consumo de fibras e o alto teor de lipídios na dieta, ingestão elevada de álcool e maior prevalência de tabagismo.²⁵

2.2 Avaliação clínica e anátomo-patológica dos tumores colorretais: dados relevantes para o prognóstico.

Inúmeras são as variáveis consideradas na avaliação prognóstica dos adenocarcinomas colorretais. Tais dados, coletados a partir de informações clínicas ou obtidos após estudo detalhado de espécimes cirúrgicos, são utilizados na definição da indicação de tratamentos complementares e servem como base para uma estimativa das possibilidades de cura da doença.

Diversos estudos demonstraram vários fatores que estão associados a um melhor ou pior prognóstico do câncer colorretal. Philips e colaboradores²⁸ desenvolveram um

estudo sobre câncer de intestino grosso, que envolveu 2518 pacientes, através do qual relacionaram quatro variáveis que apresentaram valor prognóstico significativo na sobrevida em cinco anos destes pacientes:

- a) Profundidade da invasão das lesões na parede intestinal: pacientes com lesões limitadas à submucosa demonstraram melhores taxas de sobrevida do que aqueles que apresentavam tumores invadindo a muscular própria do intestino. Estes últimos tinham também sobrevida superior aos casos com invasão transmural da parede intestinal, o que já havia sido demonstrado por Dukes (conforme quadro 1).
- b) Ocorrência de invasão linfática da cadeia regional do intestino grosso.
- c) Grau de diferenciação celular do tumor.
- d) Identificação da invasão de vasos sanguíneos por células neoplásicas.

Ying e colaboradores²⁹ ao pesquisarem 613 pacientes com tumores gastrointestinais, concluíram que o estágio clínico patológico da doença apresentou forte associação com o prognóstico.

Os critérios de invasão da parede intestinal e a ocorrência de metástases em linfonodos regionais compõem os aspectos mais relevantes do estadiamento anátomo-patológico do câncer colorretal.³⁰ São reconhecidos como de importância prognóstica desde os trabalhos de estadiamento descritos na classificação de Dukes.

A classificação Dukes é um sistema de estadiamento mais antigo, tendo sido proposto pelo Dr. Cuthbert Dukes, em 1932. nódulos linfáticos, nódulo linfático apical invadido. D: Presença de metástases distantes.³⁰

O sistema de estadiamento mais usado recentemente, associado muitas vezes a classificação de Dukes, é o da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, a qual utiliza o sistema “*tumor, node, metastases*” (TNM). Este possui três categorias, cada uma com números indicando a severidade da extensão do tumor. "T" denota o grau de invasão da parede intestinal, "N" o grau de envolvimento de nódulos linfáticos, e "M" a presença de metástases. Os estágios são descritos em numerais romanos (I, II, III, IV).^{30,31}

Os carcinomas de cólon e reto são subdivididos, neste último sistema, no que se refere à invasão da parede do intestino, em: lesões limitadas à mucosa (Tis); aqueles com invasão da submucosa (T1); os que atingem a muscular própria (T2); os casos que ultrapassam a muscular própria do intestino e chegam à serosa ou a regiões não peritonizadas peri-intestinais (T3), como no caso do reto; e, por fim, os que invadem estruturas adjacentes (T4). Quanto à presença de metástases linfáticas, os tumores colorretais se subdividem em: metástases ausentes (N0); de 1 a 3 linfonodos pericólicos ou peri-retais envolvidos (N1); quatro ou mais linfonodos peri-intestinais envolvidos (N2).

Abaixo é apresentado um resumo segundo o estadiamento TNM e sua correlação com a classificação de Dukes.

Quadro 1. Estadiamento TNM (AJCC) para o câncer colorretal e correlação com a classificação de Dukes

ESTÁGIO	T	N	M	DUKES
0	Tis	N0	M0	
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	
II	T3	N0	M0	B
	T4	N0	M0	
III	Qualquer T	N1	M0	C
	Qualquer T	N2	M0	
	Qualquer T	N3	M0	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	

Fonte: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2009

Da mesma maneira que Philips e colaboradores²⁸, diversos autores descreveram a relação entre o estágio da doença e a sobrevida dos pacientes afetados pelo adenocarcinoma do cólon e reto.

Lindmark,³² em 212 casos de tumores colorretais, observou que o estágio clínico-patológico da doença foi a variável mais fortemente relacionada à sobrevida, dentre outras avaliadas.

Shen³³ revisando dados clínicos - patológicos retirados de ressecções cirúrgicas de 434 pacientes com câncer de cólon e reto encontrou uma forte associação entre o tamanho do segmento ressecado, a idade dos pacientes e a localização do tumor.

Weitz,³⁴ em uma revisão sobre os fatores prognósticos nos tumores colorretais, concluiu que os determinantes clínico-patológicos mais significativos no resultado do tratamento destas neoplasias são aqueles vistos no estadiamento patológico, ou seja, o grau de penetração na parede intestinal e a ocorrência de metástases linfáticas.

Revisão Bibliográfica

Ying²⁹ estudando tumores colorretais, considerou que o estágio da doença apresenta grande relação tanto com a sobrevida em 5 anos, quanto com a sobrevida livre de neoplasia.

Além do estadiamento anátomo-patológico, diversas características dos tumores foram testadas com relação à sobrevida dos pacientes.

A relação entre a idade dos pacientes e as perspectivas de sucesso do tratamento do câncer colorretal tem se mostrado, na literatura, um ponto controverso, Arbman,³⁵ investigando 596 pacientes operados por carcinoma do cólon e reto, não encontrou relação entre a idade no momento da cirurgia e a sobrevida dos indivíduos analisados, corroborando com os achados de Hotokezak.³⁶

Dy,³⁷ numa casuística de 3407 pacientes seguidos por mais de 5 anos, não encontrou diferenças significativas em relação a idade, sexo e grau do tumor. Andereggen e colaboradores,³⁸ em um estudo envolvendo pacientes com idade acima de 80 anos com diagnóstico de neoplasia de intestino grosso e reto, não observaram relação entre a idade e a sobrevida em longo prazo, dos indivíduos submetidos a tratamento cirúrgico.

Os autores observaram que o número de óbitos foi maior no grupo de maior idade, mas que tal fato ocorreu devido à maior frequência de doenças concomitantes nas faixas etárias mais elevadas.

Em outro estudo que envolveu registros de 5586 pacientes tratados por câncer de cólon, Whittle³⁹ observou que a sobrevida em um ano dos indivíduos acima de 85 anos

Revisão Bibliográfica

era de 65% em comparação com 85% para aqueles com idade entre 66 e 69 anos. Na sobrevida em dois anos, os números diminuíam para 50% e 75% respectivamente.

A tendência para diminuição da sobrevida com o aumento da idade foi significativa tanto para um ano quanto para dois. Igualmente, ao estudar 212 casos de câncer colorretal, Lindmark³² encontrou associação entre idades mais elevadas e um pior prognóstico oncológico.

A questão não está definida, mas a tendência atual é a de se supor que o prognóstico do câncer colorretal, não é pior para aqueles indivíduos mais idosos.³⁴ Por outro lado, os pacientes abaixo de 40 anos parecem apresentar um maior risco de recorrência da doença, o que pode estar relacionado tanto a um comportamento biológico mais agressivo dos tumores, quanto a um atraso no início do tratamento pela suposição de que os sintomas referidos estejam relacionados a uma doença benigna.³⁴

No que diz respeito à localização da lesão primária, as evidências científicas acumuladas até o momento mostram um resultado também conflitante entre as experiências dos vários autores. Existem diversos relatos de que o carcinoma do reto apresenta um pior prognóstico oncológico quando comparado aos tumores de cólon.^{34,40,41}

A razão para tal diferenças, pode ser atribuída a uma maior dificuldade na obtenção de margens mais amplas e confiáveis, em função das restritas condições de se intervir cirurgicamente na pelve.³⁸ ou, por um comportamento biológico distinto entre tumores do reto e lesões do cólon.³⁹

Entretanto, Philips e colaboradores²⁸ não encontraram relação entre a localização primária do tumor e a recorrência mais frequente da doença em uma grande amostra de pacientes. Toyoda,²⁷ Shen³³ e Lindmark³² também chegaram a essa mesma conclusão, não encontrando diferença significativa nas taxas de recorrência entre tumores de reto e do intestino grosso.

Analisando somente lesões colônicas, Eisenberg⁴⁰ demonstrou uma recorrência mais frequente da doença entre tumores do cólon esquerdo do que do cólon direito. No entanto,

Steinberg,⁴¹ analisando 572 pacientes com câncer de intestino grosso, concluiu que a localização do tumor tinha pouca importância prognóstica, não afetando a sobrevida geral ou a sobrevida livre de doença.

Shen³³ e Lindmark³² chegaram a mesma conclusão, não observando diferenças significativas quanto à sobrevida, entre lesões situadas no cólon esquerdo, ceco e cólon direito ou transversal.

Com relação ao grau de diferenciação histológica, a literatura demonstra resultados muito mais uniformes no que diz respeito a sua importância prognóstica do que o observado para idade dos pacientes e localização primária do tumor no intestino. O grau de diferenciação histológica foi relacionado à tendência de invasão linfática, à profundidade da invasão tumoral na parede intestinal, à fixação a estruturas adjacentes e ao número de linfonodos envolvidos.⁴²

Derwin,⁴² analisando os dados referentes a 136 pacientes com câncer colorretal, demonstrou que o grau de diferenciação celular apresentava importante relação com a

possibilidade de metástases em linfonodos regionais, sendo que os mesmos constituíam um importante marcador de sobrevivência. Shen³³ encontrou um número significativamente maior de óbitos relacionados à neoplasia, naqueles tumores pouco diferenciados, em comparação com os de maior grau de diferenciação celular.

Lindmark³² também demonstrou um pior prognóstico relacionado a pouca diferenciação dos tumores colorretais. O grau de diferenciação histológica representa uma das variáveis com maior influência na sobrevida em cinco anos dos pacientes tratados por carcinoma do cólon e reto.²⁸

Outra variável já pesquisada foi a dimensão das lesões colorretais. O tamanho dos tumores foi muitas vezes relacionado a um melhor ou pior prognóstico, tanto para a ressecção, quanto para a sobrevida geral dos pacientes.^{33,42}

Ying e colaboradores²⁹ não encontraram relação entre o tamanho dos tumores colorretais e a sobrevida dos pacientes, quando o tamanho tumoral foi analisado como variável única. Entretanto, quando ajustada para outros fatores relacionados à doença, a dimensão dos tumores de cólon e reto se mostrou bastante significativa, quanto ao prognóstico das lesões tratadas.

Matsuda e colaboradores,⁴³ ao estudarem 583 pacientes tratados por ressecção endoscópica ou, cirúrgica, verificaram que as pequenas lesões de câncer colorretal invasivo apresentaram a mesma agressividade e potencial de malignidade que as grandes lesões cancerígenas.

Clodoaldo,⁴⁴ ao classificar 156 doentes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretais submetidos à extirpação curativa, classificados como Dukes B e

diferenciação celular em baixo e alto grau de malignidade, de acordo com a área de diferenciação da neoplasia, chegou à conclusão de que somente o crescimento da margem invasiva influenciou a sobrevida de 5 anos, ou seja, doentes com neoplasia exibindo margem do tipo expansivo apresentaram sobrevida significativamente maior que aqueles com margem do tipo infiltrativo.

Shen³³ por outro lado, observou que lesões medindo de 3,5 até 6 cm, apresentavam melhor sobrevida do que grupos de tumores com mais de 6 cm, bem como de lesões com menos de 3,5 cm.

Antié,⁴⁵ estudando 80 pacientes operados por carcinoma colorretal, entre 1992 e 2001, encontrou relação entre o tamanho do tumor, grau de maturação e o envolvimento de vasos sanguíneos, com o desenvolvimento de metástases hepáticas.

Wolmark,⁴⁶ revisando dados de 906 pacientes tratados por câncer colorretal, não encontrou relação entre o maior diâmetro dos tumores primários e a ocorrência de metástases linfáticas regionais.

Ishibashi e colaboradores,⁴⁷ analisando dados de 55 pacientes com diagnóstico de carcinoma colorretal que apresentavam metástases hepáticas, não encontraram relação com o tamanho dos tumores e aumento de linfonodos positivos; tanto o diâmetro aumentado, quanto diminuído, apresentaram o mesmo número de linfonodos.

Bodingbauer e colaboradores⁴⁸ também não encontraram associação significativa entre o tamanho da margem cirúrgica e a recorrência tumoral, ao examinar dados demográficos, cirúrgicos, sítio de recorrência e dados de sobrevida em longo prazo. A tendência atual na literatura especializada é de considerar o tamanho dos carcinomas

colorretais como de pouco valor prognóstico, principalmente quando esta variável é analisada isoladamente.²⁹

Por fim, a ocorrência de invasão vascular, principalmente invasão venosa, foi amplamente demonstrada em tumores malignos de cólon e reto.^{33,49,50,51}

Talbot e colaboradores⁴⁹ observaram que a ocorrência de metástases hepáticas aumentou significativamente naqueles pacientes com invasão de vasos sanguíneos adjacentes ao tumor primário. O prognóstico foi ainda pior naqueles indivíduos em que a invasão ocorreu em veias localizadas fora do limite da parede intestinal.

Minsk e colaboradores⁵¹ também relataram um prognóstico adverso naqueles casos em que foi demonstrado comprometimento dos vasos sanguíneos, principalmente quando a lesão envolvia vasos extramurais.

Wang e colaboradores,⁵² ao estudarem a correlação da expressão da angiopoietina-2 com a vascularização e o tamanho do tumor adenocarcinoma colorretal, verificaram que a alta densidade microvascular (DMV) estava associada com um menor grau de diferenciação e, o aumento da expressão de angiopoietina-2 poderia ser responsável pela formação de vasos sanguíneos e um rápido aumento do adenocarcinoma colorretal.

Shirouzu⁵³ observou um aumento significativo na recorrência local e no surgimento de metástases hepáticas em pacientes que apresentavam invasão vascular peri-tumoral, demonstrando também uma diminuição importante da sobrevida nestes casos.

2.3 Angiogênese tumoral: fisiopatologia e importância clínico-patológica.

O estudo da relação dos tumores malignos com o seu suprimento sanguíneo regional vem ganhando importância cada vez mais significativa na literatura. Não só a invasão vascular, mas a habilidade que as lesões adquirem de controlar o seu próprio aporte de sangue, constitui atualmente motivo de atenção e pesquisa e é o tema deste estudo.

Chamamos angiogênese ao processo de formação de novos vasos sanguíneos. Tal mecanismo é observado fisiologicamente em inúmeras funções e fases de desenvolvimento do organismo.⁵⁴

A angiogênese pode ser induzida nos tecidos pela redução na tensão residual de oxigênio, devido a um suprimento vascular insuficiente, quando se inicia o processo de hipóxia. A hipóxia tecidual induz a liberação de fatores de crescimento e desequilibra o processo normal de ajuste entre os fatores pró e antiangiogênicos, formando novos capilares no tumor, a partir das células endoteliais pré-existentes.⁵⁵

Novos vasos são fundamentais no desenvolvimento dos tecidos normais, no processo de reprodução e crescimento embrionário e na cicatrização de feridas.⁵⁶

A neovascularização, entretanto, também é um processo associado ao surgimento e ao desenvolvimento de diversas doenças no ser humano. Dentre estas, o câncer tem sua progressão e letalidade associadas à aquisição da habilidade de controlar seu próprio suprimento sanguíneo, viabilizando assim o crescimento ilimitado e descontrolado que caracteriza a doença.^{56,57}

Folkman⁵⁸ foi um dos pioneiros no estudo do controle, por parte das neoplasias malignas, da proliferação de vasos sanguíneos adjacentes à lesão. A constatação de que a frequência de surgimento de tumores *in situ* observados em estudos de autópsia é significativamente maior do que a de tumores malignos francamente invasores, especialmente nas lesões de mama, tireóide e próstata, indica que a ocorrência de disseminação sistêmica é um evento relativamente infrequente.⁵⁷

A incapacidade de progredir como lesão neoplásica, segundo o mesmo, reside no fato de que tumores *in situ* não adquiriram um fenótipo angiogênico que possibilitasse seu crescimento.⁵⁷

A teoria de desenvolvimento tumoral de Folkman baseia-se em vários aspectos. Inicialmente, a maioria das lesões apresenta uma fase de aparente inatividade proliferativa associada a um estágio praticamente avascular.^{57,59} A nutrição destas células depende principalmente da difusão de nutrientes pelos tecidos adjacentes, o que limita seu tamanho a aproximadamente 1 ou 2 mm.^{50,59}

Em uma segunda fase, estes pequenos tumores adquirem uma capacidade de recrutar células endoteliais de vasos sanguíneos normais do tecido hospedeiro, formando novos capilares que circundam e posteriormente permeiam a lesão, possibilitando a progressão de seu crescimento ilimitado.^{57,59}

Esta habilidade de gerar suprimento sanguíneo foi creditada à produção, por parte das neoplasias, de um agente bioquímico inicialmente chamado de fator de angiogênese tumoral.⁶⁰ Logo, se tornou extremamente atraente a possibilidade de se criar uma substância com função bloqueadora do fator angiogênico como forma de

tratamento de tumores malignos, reconhecendo-se que tal medida provavelmente reduziria a lesão a um tamanho em que o suprimento sanguíneo não mais seria fundamental para a sobrevivência das células (1 ou 2 mm).⁶⁰

O câncer não seria, portanto, erradicado, mas teria uma regressão sustentada enquanto o bloqueio angiogênico fosse mantido.⁶¹ Estas hipóteses constituem a base teórica para o uso terapêutico de drogas bloqueadoras da angiogênese.

O primeiro alvo para um bloqueio da angiogênese tumoral foi identificado, em 1984, por Shing e colaboradores,⁶⁰ em amostras de condrossarcoma, tendo sido chamado fator básico de crescimento de fibroblastos. Apesar de seu uso em modelos experimentais haver resultado no crescimento de capilares sanguíneos, esta substância não parecia ser um agente de importância significativa.

Foi com as descrições que se seguiram de um novo agente associado à permeabilidade vascular e à angiogênese, inicialmente chamado de fator de permeabilidade vascular e, posteriormente, de fator de crescimento do endotélio vascular, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), que se obteve uma substância com representatividade clínica significativa e alvo de medidas terapêuticas.⁶¹

O VEGF é, possivelmente, o mais potente agente angiogênico conhecido.^{50,62,63} Sua presença aumenta a permeabilidade vascular e constitui um importante estímulo para a mitose de células endoteliais.^{50,64} Sua expressão tem sido associada com o estágio avançado e menor sobrevivência de vários tipos de cânceres.⁶⁵

Em situações de hipóxia, é possível observar um aumento significativo dos níveis de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para VEGF, bem como da proteína

resultante.^{50,62,63} Outros agentes biológicos parecem interferir na produção de VEGF: as interleucinas 1 β , 6 e 8; o fator de crescimento derivado de plaquetas; o fator de crescimento de hepatócitos; o fator beta de crescimento de fibroblastos e, os fatores de crescimento de transformação (TGFs – “*transforming growth factors*”).⁶⁵

Finalmente, Weidner,⁶⁶ concluiu que o polimorfismo do gene VEGF poderia ser usado como um fator prognóstico independente para pacientes com carcinoma colorretal.

Uma vez identificadas algumas das fontes do estímulo angiogênico, a próxima descoberta significativa foi a correlação entre o grau de neovascularização tumoral e o prognóstico adverso observado em vários tipos de lesões malignas.⁵⁹

Neste campo de estudo, os achados pioneiros de Weidner e colaboradores,⁶⁵ são o ponto de partida para a correlação entre a densidade de microvasos tumorais e o comportamento clínico destas lesões. A vascularização tumoral, segundo este autor, é quantificada através da aplicação de método imunoistoquímico para antígenos presentes em células endoteliais como o CD31, CD34 e o fator VIII (fator de Von Willebrand).

Os vasos corados pelo método são contados em microscopia de grande aumento nas áreas de maior concentração vascular, os chamados “*hot-spots*”.⁶⁵

Usando esta metodologia, Kim e colaboradores⁶⁵ analisaram dados de 49 pacientes com carcinoma de mama invasivo. Os resultados demonstraram que a contagem de microvasos foi significativamente maior no grupo de pacientes que desenvolveram doença metastática, seja sistêmica ou axilar, sugerindo que a densidade

microvascular poderia ser um fator preditivo independente para desenvolvimento de metástases a partir de neoplasias malignas de mama.

Desde então, esta metodologia foi utilizada para avaliar a neovascularização de diversos tipos de lesões neoplásicas, bem como a sua relação com o prognóstico dos pacientes tratados.

É possível encontrar estudos relacionando as DMV com inúmeros tumores de diversos sistemas. Uma revisão neste sentido mostra que o significado clínico deste parâmetro de quantificação da angiogênese tumoral apresenta ampla variação quanto a sua importância prognóstica.⁶⁷

Em tumores de cabeça e pescoço, por exemplo, os estudos recentes apresentam resultados conflitantes.

Cantu de Leon e colaboradores,⁶⁸ avaliando 118 pacientes portadores de carcinomas do tipo epidermóide da região cervical, encontraram correlação entre DMV elevada e recorrência tumoral, nos casos identificados como estágio II e, em pacientes com idade inferior a 40 anos. Em lesões de estágio clínico mais avançado, entretanto, os autores não encontraram relação entre a DMV e o prognóstico.

Torre e colaboradores,⁶⁹ avaliando lesões proliferativas de paratireóide, observaram que a DMV estava aumentada em adenomas, mas que este dado não se relacionava com o comportamento clínico das lesões, utilizando-se como critérios o tamanho dos tumores e os níveis séricos de hormônio paratireóide e cálcio.

Brieger e colaboradores,⁷⁰ estudando neurinomas de nervo acústico, observaram que, nos 34 casos avaliados, a contagem microvascular não se correlacionava com o tamanho dos tumores, a duração dos sintomas ou a idade dos pacientes.

Em neoplasias ginecológicas, Naya e colaboradores⁷¹ avaliaram a intensidade da neovascularização em endométrios normais, hiperplásico e no adenocarcinoma. Os autores observaram que alterações na DMV se correlacionavam com estágios progressivamente mais graves da doença endometrial, com DMV inferior em endométrios proliferativos e hiperplasia simples e, mais elevada, em hiperplasias com atipias significativas e adenocarcinomas.

Em neoplasias de ovário, por outro lado, Sonmezer e colaboradores⁷² não encontraram correlação entre a DMV, a sobrevida ou parâmetros anátomo-patológicos. Os níveis de VEGF também não se mostraram de importância significativa, ocorrendo correlação estatística somente com o volume de ascite. Os autores não observaram também, relação entre a intensidade de marcação imunoistoquímica para VEGF e a DMV nestes tumores.

No trato gastrointestinal, há diversos estudos demonstrando a importância prognóstica da DMV em tumores de esôfago, estômago, fígado, pâncreas e cólon. Tais estudos trazem dados comparativos de especial interesse para nossa linha de pesquisa.

Em carcinomas de esôfago, Du e colaboradores⁷³ observaram que 81,36% das lesões expressavam VEGF, resultando em índices aumentados de densidade microvascular. Tais dados demonstraram relação significativa com o grau de

diferenciação tumoral e metástases linfáticas, não tendo sido observada importância significativa na profundidade de penetração na parede intestinal.

Nakagawa e colaboradores,¹¹ analisando dados de 103 esofagectomias por carcinoma epidermóide do esôfago, observaram que a DMV guardava relação com a profundidade de penetração do tumor na parede do órgão, ocorrência de metástases intramurais, índices elevados de recorrência pós-operatória e pior sobrevida geral.

Em adenocarcinomas gástricos, Chung e colaboradores⁷⁴ avaliaram a relação entre a intensidade da expressão do VEGF, a DMV, a sobrevida geral e os índices de recorrência metastática em indivíduos submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa. A DMV foi significativamente mais alta em lesões VEGF positivas, sendo que tais pacientes tiveram um índice de 66,7% de recorrência, comparados a 16,7% naqueles com VEGF negativo.

Foi observado que 67,5% dos adenocarcinomas de estômago expressavam VEGF, sendo a contagem microvascular nestas lesões maior do que a encontrada em patologias benignas. Na avaliação destes autores, a DMV foi significativamente maior em tumores avançados quando comparados a lesões precoces.⁷⁴

Ichinoe e colaboradores,⁷⁵ comparando adenocarcinomas gástricos precoces de padrão de crescimento superficial ou infiltrativo, encontraram uma forte relação entre a DMV, a expressão de VEGF, de óxido nítrico sintetase e ciclo-oxigenase-2 neste último tipo de tumor, enquanto que as lesões de crescimento superficial apresentavam fraco padrão de neovascularização.

Por fim, Tsujitani e colaboradores⁷⁶ relataram que a DMV, o tamanho dos tumores e a presença de metástases linfáticas foram fatores preditivos independentes do prognóstico de adenocarcinomas de estômago, sendo que a densidade de microvasos foi maior naqueles casos em que o VEGF estava significativamente expresso.

Nas neoplasias pancreáticas, Tan e colaboradores⁷⁷ demonstraram que tumores neuroendócrinos não apresentavam comportamento desfavorável mesmo com contagem elevada de microvasos. Por outro lado, diversos estudos observaram um melhor prognóstico para adenocarcinomas do pâncreas que se mostravam hipovascularizados.⁷⁸

Em hepatocarcinomas, Yao e colaboradores⁷⁸ observaram dados prognósticos significativos com relação à DMV. Em 90,9% dos casos metastáticos, os tumores expressavam VEGF, contra 63,9% das lesões localizadas.

A contagem de microvasos acompanhou a taxa de expressão do VEGF, sendo ambas maiores nas lesões não encapsuladas, pouco diferenciadas e metastáticas. Tanto a DMV quanto os índices de expressão do VEGF se correlacionaram com a intensidade de invasão vascular e com a disseminação sistêmica em tumores primários de fígado.⁷⁸

No câncer colo-retal, objeto do presente estudo, a análise do significado clínico da contagem microvascular apresenta resultados conflitantes.

Em 1994, Saclarides e colaboradores⁷⁹ encontraram em sua casuística de 48 indivíduos portadores de adenocarcinoma do reto que a DMV aumentada foi relacionada a estágios anátomo-patológicos mais avançados, maior tamanho dos tumores e maior recorrência metastática.

Choi e colaboradores⁸⁰ demonstraram em 51 pacientes com câncer de esôfago que a alta densidade vascular é fator independente de prognóstico para a presença de metástase linfonodal com pior sobrevida para estes pacientes.

Tzanakis e colaboradores⁸¹ observaram em estudos clínicos, que altos níveis de expressão de VEGF e aumento da densidade microvascular em tumores, foram associados com o avanço da doença e pior prognóstico de vários tipos de tumores, incluindo o câncer colorretal. A estes achados foram somadas evidências apontando para uma correlação entre a DMV e a ocorrência de metástases por via hematogênica.

Tanigawa e colaboradores,⁸² em 133 casos de câncer colo-retal, observaram que a contagem microvascular foi significativamente maior no grupo de pacientes que foram a óbito em decorrência de recidiva da neoplasia quando comparados com os indivíduos livres de doença.

A DMV elevada apresentou correlação estatisticamente significativa com a ocorrência de metástases por via hematogênica, tumores pouco diferenciados e maior profundidade de penetração na parede intestinal pela lesão.⁸²

Kaio e colaboradores⁸³ relacionaram a elevada intensidade da expressão de agentes angiogênicos na extremidade mais profunda de invasão de adenocarcinomas colo-retais, com índices elevados de DMV. Tal associação mostrou resultados significativos quanto ao risco de metástases hematogênicas e menor sobrevida global dos pacientes.

Por fim, Tarta⁸⁴ observou que a proliferação vascular acompanha o desenvolvimento dos tumores colo-retais, com números progressivamente maiores de microvasos em adenomas de baixo grau, alto grau e adenocarcinomas precoces.

Nem todos os pesquisadores que analisaram a importância da contagem microvascular no adenocarcinoma colorretal chegaram a estas mesmas conclusões. Banner e colaboradores,⁸⁵ estudando 22 pacientes com carcinomas do cólon e reto com invasão transmural da parede intestinal e sem metástases linfáticas, relataram que aqueles indivíduos com sobrevida mais longa apresentavam índices de DMV maiores, quando comparados aos casos de recorrência precoce da neoplasia.

Lindmark⁸⁶ já havia observado resultados semelhantes dois anos antes. Sua série de 227 pacientes com adenocarcinoma colorretal demonstrou uma maior sobrevida nos casos com DMV elevada, sendo que não se observou relação entre a contagem dos vasos sanguíneos tumorais e o grau de diferenciação celular dos tumores ou o estágio clínico da doença.

Cianchi e colaboradores⁸⁷ também relataram uma associação entre DMV elevada e melhor comportamento clínico de tumores do reto, sem metástases para a cadeia linfática regional.

Os autores⁸⁷ observaram, ainda, que contagens elevadas de vasos sanguíneos tumorais eram acompanhadas de um aumento na infiltração linfocitária das lesões, o que poderia indicar uma melhor resposta imune celular, a qual se correlacionaria com um melhor prognóstico. Estes mesmos linfócitos seriam os responsáveis pelo estímulo angiogênico aumentado através da liberação de agentes pró-angiogênicos.

Abdalla e colaboradores⁸⁸ descreveram uma série de pacientes tratados por adenocarcinoma do cólon e reto em que a DMV mais elevada foi associada com melhor prognóstico e sobrevida.

Estes autores⁸⁸ também descrevem a importância da reação inflamatória tumoral como agente estimulante da produção de vasos sanguíneos, devendo-se levar em consideração outros fatores como expressão de oncogenes, composição da matriz extracelular, moléculas de adesão intercelular, fatores de crescimento tumoral e grau de apoptose, que poderiam interferir na interpretação dos resultados.

Boxer e colaboradores⁸⁹ da mesma maneira observaram um pior prognóstico nos pacientes com índices de DMV baixos em casos de carcinoma colo-retal sem invasão linfática. Estes mesmos autores descreveram que a expressão do VEGF na extremidade invasora da lesão maligna guardava importante relação com a recorrência tumoral sistêmica, mesmo com contagens microvasculares reduzidas nesta mesma região.

A deficiência de vascularização dos tumores nas margens invasoras que conduziria à hipóxia, um importante estímulo à produção do VEGF, poderia explicar estes achados. Tal fato teria importância clínica significativa uma vez que justificaria o uso de agentes anti-angiogênicos bloqueadores de VEGF mesmo em casos com contagens vasculares tumorais reduzidas.⁸⁹

Frente a estes achados conflitantes na literatura, o estudo de outros fatores associados à angiogênese tumoral, além da simples contagem dos vasos, parece fundamental para uma melhor compreensão da biologia das lesões abrindo-se assim mais uma possibilidade de expandir o arsenal terapêutico oncológico.

2.4 Fator tecidual: funções fisiológicas e importância no desenvolvimento de neoplasias malignas.

Estudos pioneiros, que datam do final do século XIX, demonstraram que o mecanismo de coagulação sanguínea resulta da interação entre protrombina, cálcio, fibrinogênio e um quarto fator conhecido como tromboplastina ou, mais comumente, (FT).^{85,90}

O fator tecidual (FT) é fisiologicamente desencadeador da coagulação sanguínea, mas pode também ter um importante papel no câncer, pela regulação da expressão do (VEGF) e da angiogênese.⁹¹

O fator tecidual é uma proteína que tem envolvimento no início da coagulação sanguínea, tendo participação, no aumento tumoral, nas metástases e angiogênese..⁹²

O FT desempenha uma função fundamental na cascata de coagulação sanguínea ao combinar-se com o fator VII, complexo este que tem ação proteolítica, resultando na ativação dos fatores IX e X, desencadeando a sequência de reações que terminam por converter fibrinogênio em fibrina, levando à formação final do coágulo.^{85,92,93}

Em sua forma madura, o FT, uma proteína trans-membrana, apresenta 219 aminoácidos em sua porção extracelular, 23 aminoácidos na cadeia trans-membrana e 21 na sua porção citoplasmática.⁹⁴ Ele é classificado como um membro da família dos

Revisão Bibliográfica

receptores de fatores de crescimento hematopoiético que também incluem os receptores do interferon alfa e da interleucina.

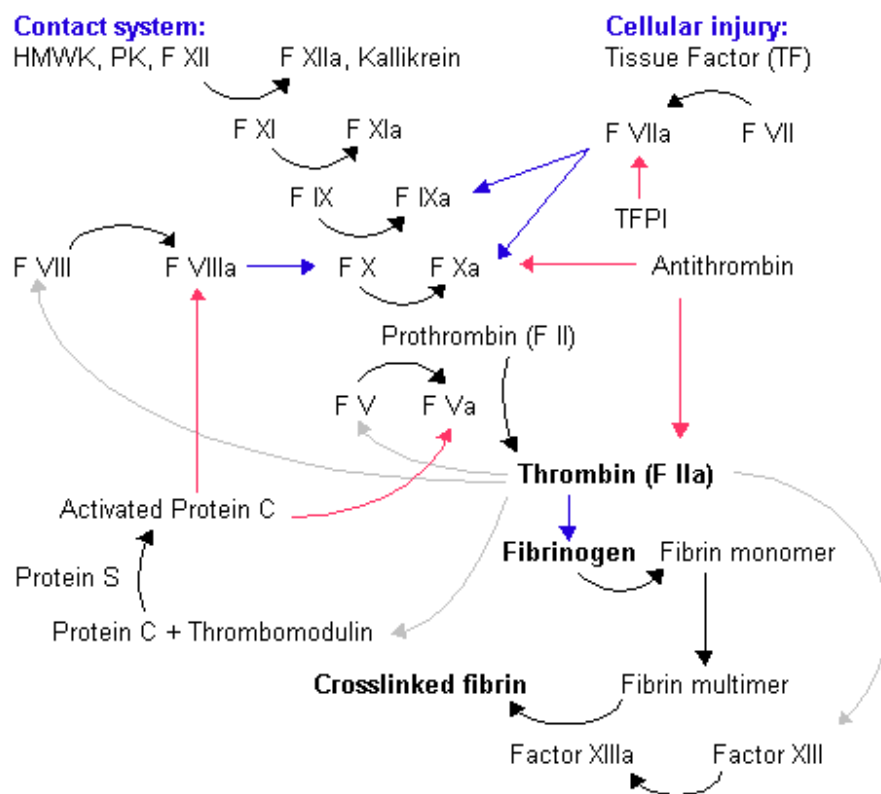


Figura 1. Cascata de coagulação Fonte:Wikimedia Commons

Usualmente, o FT está presente nos fibroblastos da adventícia de vasos sanguíneos, em cápsulas de órgãos, células epiteliais de pele e mucosas, células do estroma endometrial e astrócitos no sistema nervoso central.⁵⁴

Não foi detectada a presença de FT em células intravasculares, como o endotélio normal, sugerindo que ele constitui um envelope hemostático no caso de ruptura da integridade vascular ou tecidual.⁵⁴

Acredita-se também que o FT apresente efeitos morfogênicos, por exemplo, sobre células de músculo liso. Na placa aterosclerótica, estudos demonstraram que ele é expresso em macrófagos e na musculatura vascular.⁵⁴

Toshi e colaboradores⁹⁵ demonstraram que o FT está presente nas placas ateroscleróticas ricas em lipídios e sugeriram que ele representa um forte estímulo trombogênico sobre estas lesões ateromatosas, principalmente após a ruptura espontânea da placa. Por outro lado, após lesão mecânica arterial, como visto na angioplastia ou dilatação com balão, ocorre a migração de células de músculo liso que participam da reparação do trauma.

Este efeito benéfico, mediado em parte pelo FT, representa uma contrapartida vantajosa ao risco de trombose, associado à exposição do FT a proteínas plasmáticas relacionadas à coagulação. De fato, estudos demonstraram que a neutralização do complexo FT/Fator VII ativado (FT/FVIIa) resulta em diminuição da espessura da íntima arterial.⁹⁶

O FT é o principal desencadeador da cascata de coagulação, sendo um componente fundamental da placa aterosclerótica. Recentemente, foi demonstrado que ambos FT e A MMP-9 (Metaloproteinases matriz) estão super-expressos em placas arteroscleróticas, sugerindo um papel de ambas as moléculas na trombogenicidade e instabilidade da placa.⁹⁷

Também foi identificada a expressão do fator tecidual em diversas células de tecidos embrionários, como epitélios, cardiomiócitos, células do endoderma visceral, músculo liso vascular e tecido neural, especialmente durante períodos de

desenvolvimento embrionário nos quais os fatores de coagulação não estão presentes ou são incapazes de cruzar a barreira placentária.⁵⁴

Mais recentemente, estudos com inativação de genes revelaram que a deficiência do FT é letal para embriões, em função de um desenvolvimento vascular comprometido.⁵⁴

Outras circunstâncias podem induzir a expressão do FT. Citocinas inflamatórias (como o fator de necrose tumoral),^{54,98} mitógenos (como o VEGF, insulina e o fator de crescimento de fibroblastos), hormônios, endotoxinas, infecções virais, hipóxia e trauma mecânico foram também associados a um aumento de atividade desta proteína.⁵⁴

Além destas funções reconhecidas, o FT pode apresentar outras funções não relacionadas à coagulação sanguínea. Sua expressão se encontra aumentada em vários tipos celulares tumorais que apresentam atividade pró-coagulante.^{67,92}

Recentemente, o FT também foi relacionado ao desenvolvimento de metástases através de mecanismos de sinalização intracelular, bem como através da atividade proteolítica do complexo FT/Fator VII ativado.^{87,99} Esta associação entre a expressão do FT e o desenvolvimento de neoplasias malignas é o foco central de nossa pesquisa.

A relação entre os mecanismos de coagulação e o desenvolvimento do câncer é reconhecida há bastante tempo.

Em 1865, Armand Trousseau observou que pacientes que se apresentavam com trombo-embolismo sintomático, frequentemente eram também portadores de uma neoplasia maligna oculta. Ele também notou que indivíduos reconhecidamente portadores de um tumor maligno apresentavam uma tendência aumentada para

fenômenos de natureza trombo-embólica. Levantamentos estatísticos mais recentes mostraram que esta observação é bastante precisa.⁸²

Em pacientes com neoplasia de mama, a incidência de trombose e embolia é de 0,1% no estágio clínico I, incidência esta que chega a 18% nos estágios III e IV.⁹⁹

No plano inverso, indivíduos com tromboembolismo sem uma condição clínica aparente e detectável apresentam um risco significativamente aumentado, podendo chegar até a nove vezes o observado na população em geral, de terem diagnosticada uma neoplasia maligna nos seis meses a um ano subsequentes.^{99,100} Esta chance é ainda maior se um segundo episódio de trombose ocorrer.^{100,101}

A expressão FT encontra-se aumentada em neoplasias como as de pequenas células de pulmão,¹⁰² os gliomas,¹⁰³ e os carcinomas de mama,¹⁰⁴ pâncreas,^{105,106} cólon,⁸ próstata,¹⁰⁷ sendo também relacionada com estágios avançados destas doenças.

O FT desempenha um papel crucial na fisiopatologia do câncer, devido à capacidade de estimular a expressão gênica do VEGF e, através dele, criar uma proliferação vascular tumoral exagerada, o que poderia levar ao desenvolvimento do tumor e sua habilidade de produzir metástases.^{93,108,109}

A alteração na homeostase angiogênica está associada a um desequilíbrio no balanço de fatores pró-angiogênese e anti-angiogênese, que normalmente manteriam a proliferação de células endoteliais sob controle.¹⁰³

O FT parece interferir neste equilíbrio através de um estímulo à expressão do VEGF^{103,110} e também na supressão da trombospondina, um peptídeo anti-angiogênico.⁹⁰

Revisão Bibliográfica

Além disto, tanto o FT quanto o VEGF têm expressão aumentada na hipóxia, fenômeno frequentemente observado no câncer.¹¹⁰

Aparentemente, duas vias fisiopatológicas existem para explicar o estímulo angiogênico do FT.⁹² Uma delas é dependente do mecanismo de coagulação^{95,110} e a outra não.^{92,94}

No primeiro caso, a rota angiogênica dependente de coagulação resulta da ativação da trombina via ligação do FT ao fator de coagulação VII. A presença de trombina resulta em lise dos fibrinopéptídeos A e B a partir da molécula do fibrinogênio, que determina a conversão deste em fibrina. Níveis plasmáticos elevados de fibrinopeptídeo A foram relacionados com crescimento tumoral.⁹⁰

Além disto, a presença de trombina ativa as plaquetas, que se unirão à fibrina formando o coágulo. As plaquetas ativadas liberam fatores pró-angiogênicos, dentre eles o VEGF, que contribuem para a migração e a proliferação de células endoteliais.⁹⁰

O VEGF, por sua vez, induz um aumento de permeabilidade vascular que determina um escape de proteínas plasmáticas, especialmente fibrina, as quais irão formar uma matriz ao redor das células tumorais.^{94,111,112} Esta matriz serve como base para migração de células endoteliais e para a angiogênese justa-tumoral.

Por fim, a degradação da matriz de fibrina libera novos agentes estimulantes da proliferação vascular, o que contribui para a manutenção e para o incremento do estímulo angiogênico.^{95,110,111}

Existem também evidências de que um mecanismo não diretamente relacionado à cascata da coagulação, mas ainda assim envolvendo a expressão do FT por células

tumorais represente uma fonte de estímulos angiogênicos para as neoplasias.⁹⁴ A fosforilação da porção citoplasmática do FT induz a formação de uma sequência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes.^{11,92,112,113}

O VEGF tem sua transcrição aumentada pela ativação do FT, levando a um potente estímulo angiogênico.^{17,94,109,112} Por outro lado, a trombospondina é inibida pelo FT, reduzindo a sua capacidade anti-angiogênica.⁹² Além disto, como vimos anteriormente, o aumento da atividade do VEGF por ação do FT resulta em uma permeabilidade vascular exagerada a proteínas plasmáticas, com deposição de fibrina na forma de uma matriz, junto às células tumorais.⁹²

Tal matriz representa também um estímulo a proliferação de vasos sanguíneos, uma vez que sua análise demonstrou altas concentrações de agentes pró-angiogênicos como o fator de crescimento de fibroblastos, o próprio VEGF e o fator de crescimento associado à insulina tipo 1 (IGF-1).⁹⁴

Da mesma forma, o extravasamento de proteínas plasmáticas aumenta o índice de ligação entre o fator VII e o FT. O fator VII ativado produz um aumento de cálcio intracelular que, por sua vez, estimula a fosforilação da porção intracitoplasmática do FT, completando um ciclo de retroalimentação positiva através de um novo incremento na transcrição do VEGF.⁹²

Ainda não se conhece o papel exato de cada um destes mecanismos na fisiopatologia do fator tecidual com relação ao desenvolvimento do câncer.

Hembrough e colaboradores,¹¹⁴ em uma tentativa de avaliar o papel da coagulação no crescimento de tumores, testaram, *in vivo*, inibidores específicos para o

complexo FT-FVIIa e para o fator X ativado (FXa). Estes autores demonstraram que dois inibidores do complexo FT/FVIIa conseguiram diminuir a progressão de lesões primárias e metástáticas em cobaias. Por outro lado, o uso de inibidores específicos do FXa não demonstrou atividade anti-tumoral.

Uma vez que o FXa constitui o elemento final da rota pró-coagulante do FT-FVIIa, estes dados sugerem que a ação proteolítica deste último promove a proliferação tumoral e a angiogênese por um outro mecanismo, além daquele observado através da cascata de coagulação sanguínea.⁹⁴

Foi observada uma forte correlação entre a expressão de FT e a síntese de VEGF em linhagens tumorais humanas. A inoculação destas células neoplásicas em camundongos imunossuprimidos levou ao desenvolvimento de tumores com alta taxa de densidade microvascular.⁹⁴

Ao inocular uma linhagem tumoral com baixa expressão de FT/VEGF uma sequência codificante completa do FT, estas células se tornaram produtoras destes dois elementos. Por outro lado, quando se inoculava uma sequência de FT com alterações na porção intracitoplasmática que impediam a fosforilação, o que se observava era uma intensa produção do fator tecidual, mas não do VEGF.⁹⁴

Estes resultados sugeriam que a porção citoplasmática do FT é necessária para o estímulo à produção do VEGF.

Tais achados se somam aos de Abe e colaboradores,¹¹⁴ que descreveram, através de metodologia semelhante, o comportamento de várias linhagens de melanoma em relação à expressão do FT e a angiogênese. Tumores com altas taxas de FT/VEGF,

quando inoculados em camundongos imunossuprimidos, produziam lesões sólidas altamente vascularizadas. Por outro lado, melanomas com baixa expressão destes dois elementos produziam tumores relativamente avasculares.

A inoculação de uma sequência de DNA para o FT que produza uma proteína cuja porção citoplasmática fosse inutilizada levava à expressão do FT, mas a uma baixa taxa de VEGF.¹¹⁴

Se a cadeia de DNA inoculada, por outro lado, levasse somente à inativação da porção extracelular do FT, ou seja, a porção ligante do Fator VII ativado, os níveis de VEGF eram semelhantes àqueles vistos em tumores produtores de FT.¹¹⁴

Zhang e colaboradores¹⁷ encontraram, mais recentemente, resultados similares aos descritos anteriormente; porém, utilizaram linhagens celulares de tumores gástricos. Da mesma maneira, células inoculadas com mutações da porção extracelular da molécula de FT produziam altos níveis de VEGF. Se a mutação, entretanto, afetasse a região intracelular, mesmo que a expressão do FT estivesse plenamente demonstrada, a produção do VEGF ficava significativamente comprometida.

Se, por um lado, a porção citoplasmática do fator tecidual foi associada à produção do VEGF em linhagens tumorais, a porção ligante extracelular teve sua participação associada à disseminação de tumores malignos.

Mueller e Ruf¹⁵ desenvolveram um modelo experimental de metástases hematogênicas dependentes de FT, que demonstrou a importância do complexo FT/FVIIa na evolução de lesões neoplásicas. Ao que parece, existe a necessidade da

ação proteolítica deste complexo para o favorecimento da disseminação das células tumorais através da corrente sanguínea.

Amirkosravi e colaboradores¹¹⁰ avaliaram a importância da hipóxia, um achado frequente em neoplasias malignas, no aumento da expressão do FT em tecidos tumorais. Ao cultivarem células de vários tipos de neoplasias em meios com baixa tensão de oxigênio, relataram um aumento da atividade pró-coagulante bem como da expressão do FT. Ao injetarem estas culturas em cobaias, notaram que aquelas expostas à baixa tensão de oxigênio (O₂) produziram mais trombocitopenia e metástases pulmonares, do que células cultivadas com níveis normais de O₂.

Os autores concluíram que a hipóxia aumenta a expressão do FT em neoplasias malignas, o que estimula a adesão plaquetária, facilitando o desenvolvimento de metástases hematogênicas, através de um mecanismo mais associado à atividade coagulante do FT.

Em conjunto com estes achados, diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar a frequência da expressão do FT e correlacioná-la com fatores prognósticos classicamente reconhecidos nos mais variados tipos de neoplasias malignas.

Seto e colaboradores¹¹⁶ avaliaram a expressão do fator tecidual em 67 pacientes com adenocarcinoma colo-retal, correlacionando-a com a ocorrência de metástases hepáticas. Os autores observaram que neoplasias com altas taxas de atividade do fator tecidual apresentaram um risco significativamente maior de desenvolvimento de lesões no fígado, bem como um pior prognóstico após três anos de acompanhamento.

Da mesma maneira, Nakasaki e colaboradores¹¹⁷ avaliaram a expressão de FT em 100 tumores malignos colorretais. O fator tecidual estava presente em 57% da amostra e a intensidade de sua expressão se correlacionou com a classificação de Dukes destes tumores. Além disto, observou-se uma relação significativa entre a expressão do FT e a do VEGF.

Tais dados sugerem que a expressão do FT se relaciona com o grau de progressão da doença avaliado pelos critérios de Dukes, sendo o VEGF um elemento significativo na determinação do prognóstico destes pacientes.

Contrino e colaboradores¹¹⁸ avaliaram a expressão do FT em carcinomas de mama e encontraram também uma relação prognóstica. Ao analisarem a atividade do FT na superfície vascular endotelial de pacientes portadores de neoplasias malignas, relataram que em sete casos havia atividade desta proteína em nível do endotélio assim como em células tumorais. Em comparação, em dez casos de doença fibrocística, nenhum apresentou avaliação imuno-histoquímica positiva para o FT.

Os autores¹¹⁸ concluíram que células tumorais podem ativar células endoteliais adjacentes à lesão e estimular a proliferação de vasos sanguíneos justa-tumorais através de um importante estímulo angiogênico mediado pelo fator tecidual.

Vrana e colaboradores¹¹⁹ avaliaram a expressão do fator tecidual em células do estroma peritumoral de neoplasias de mama e encontraram uma relação significativa entre a presença do FT e a progressão para o carcinoma invasor. Células positivas para o FT eram particularmente abundantes nas proximidades de lesões infiltrativas, sendo constituídas principalmente por macrófagos e miofibroblastos.

Para os autores, estes dados indicaram que o recrutamento ou ativação de células positivas para FT é um evento precoce na progressão para um carcinoma localmente invasor.

Mais recentemente, Kato e colaboradores¹²⁰ observaram um efeito sinérgico entre a progesterona e a expressão do FT em um modelo experimental baseado em células de carcinoma mamário.

A incubação de células da linhagem ZR 75 em meio rico em progesterona foi acompanhada de um aumento da atividade do RNAm e da expressão do próprio FT. Tal efeito foi acompanhado de um incremento da atividade pró-coagulante desta linhagem celular, bem como do seu potencial invasor.¹²⁰

Para os autores,¹²⁰ o efeito da progesterona estimulando a expressão do FT representa uma vantagem em termos de viabilidade das células tumorais e um risco nos casos de reposição hormonal em pacientes portadoras de câncer de mama.

Hamada e colaboradores¹²¹ avaliaram a expressão do FT em 44 espécimes cirúrgicos de gliomas. Seus dados concluíram que o nível de expressão se relacionava ao grau histológico de malignidade, uma vez que 10% dos gliomas definidos como de baixo grau apresentavam positividade para o FT, enquanto que 86% dos astrocitomas anaplásicos e 95% dos glioblastomas expressavam de forma moderada ou intensa esta mesma proteína.

Kakkar e colaboradores¹²² avaliaram 55 casos de carcinomas ductais pancreáticos quanto à expressão do FT. Observaram que tumores pouco diferenciados apresentavam

maior atividade do FT, que inclusive não estava presente em tecidos pancreáticos não neoplásicos.

Nitori e colaboradores¹²³ avaliaram a frequência da expressão do fator tecidual, correlacionando-a a fatores prognósticos também em neoplasias ductais pancreáticas. A expressão aumentada, considerada no estudo como a presença de mais de 25% das células positivas para o FT, foi relacionada a uma maior extensão do tumor primário, à ocorrência de metástases linfonodais e a tumores pouco diferenciados.

De fato, a expressão do FT se mostrou como uma variável prognóstica de valor independente para recorrência e óbito por este tipo de neoplasia.¹²³

Os autores,¹²³ relataram ainda que a inativação do FT por bloqueio do RNAm reduziu o potencial invasor *in vitro* de células tumorais pancreáticas, o que o associa com a agressividade deste tipo de tumor.

A expressão frequente do FT pelas células malignas pancreáticas representa a principal razão para ocorrência de fenômenos típicos de coagulopatia, como tromboembolismo, trombose de veia porta, coagulação intravascular disseminada e trombose venosa profunda, que aparecem como complicadores em até 57% dos indivíduos afetados por este tipo de neoplasia.¹²⁴

Poon e colaboradores,¹²⁵ estudando casos de carcinoma hepatocelular, avaliaram a relação entre a expressão do FT, a DMV e fatores prognósticos.

A atividade do FT foi associada a uma maior densidade de vasos sanguíneos, bem como, a uma elevada presença de VEGF. Além disso, tumores positivos para FT demonstraram maior ocorrência de invasão venosa, estágios clínicos mais avançados e

lesões não encapsuladas. De fato, o FT se mostrou como fator prognóstico negativo independente nestas lesões.¹²⁵

Kaido e colaboradores,¹²⁶ da mesma forma, encontraram importância prognóstica em relação ao FT em casos de carcinoma hepatocelular. Indivíduos com tumores que expressavam o FT apresentaram uma maior frequência de trombose neoplásica da veia porta, metástases intra-hepáticas, hipoalbuminemia e invasão capsular.

A sobrevida livre de doença foi significativamente maior nos pacientes com lesões negativas para atividade do FT, o que, nesta amostra, demonstrou que o mesmo é um fator prognóstico negativo independente.

Em casos de adenocarcinoma de próstata, Abdulkhadir¹⁰⁷ e Carvalhal¹² demonstraram que a atividade do fator tecidual na membrana celular teve associação direta com níveis mais elevados de PSA.

Quando quantificada a densidade microvascular nestas lesões, os índices mais elevados foram observados nos casos positivos para FT, levando os autores a concluir que a sua expressão poderia servir como um marcador da agressividade dos tumores prostáticos, assim como um indicador de angiogênese aumentada.^{107,12}

Akashi e colaboradores¹²⁷ também encontraram correlação prognóstica na expressão do fator tecidual em neoplasias de próstata. Em casos de doença metastática, 75,3% dos tumores expressavam o FT, sendo que estes indivíduos apresentaram pior desempenho clínico no tratamento com supressão hormonal.

Wang e colaboradores¹²⁸ descreveram 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 teve correlação com atividade proliferativa celular, potencial de invasão, angiogênese, produção de ascite e metástases.

Por fim, Koomagi e colaboradores¹⁴ estudaram a expressão do fator tecidual em 191 neoplasias malignas pulmonares do tipo não pequenas células. Nestes casos, a atividade do FT se correlacionou com a intensidade da expressão do VEGF e com a densidade microvascular das lesões.

A positividade das células tumorais para o FT foi também associada a um pior prognóstico, com redução significativa da sobrevida após o tratamento.¹⁴

Frente a estes achados o estudo das interações entre o fator tecidual e o câncer, especialmente no que se refere aos seus mecanismos de ação, pode abrir um campo alternativo de tratamento das neoplasias malignas, envolvendo não só o controle da expressão de substâncias pró-angiogênicas, mas também dos sistemas regulatórios da coagulação sanguínea.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Demonstrar a expressão diferencial do fator tecidual em adenocarcinomas colo-retais através da técnica de quantificação de ácidos nucleicos (mRNA) por Reação de Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).

3.2 Específicos

- Relacionar a expressão do Fator Tecidual por RT - PCR com:
 - O grau de densidade microvascular dos tumores colorretais.
 - A idade e sexo dos indivíduos que compõe a amostra.
 - A ocorrência de metástases linfáticas.
 - Localização dos tumores
-
-

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Este estudo caracteriza-se como uma pesquisa clínica do tipo transversal.

4.2 Local do estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS (preparo do material e isolamento do mRNA). As análises por técnica de Reação em Cadeia de Polimerase foram realizadas no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF) (TECNOPUC).

4.3 Seleção da amostra

A amostra foi composta de blocos de parafina de 19 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma do cólon e reto, do banco de dados, do Serviço de Colo-Proctologia do Hospital São Lucas da PUCRS, sendo que a amostra foi escolhida aleatoriamente de

Metodologia

40 blocos de parafina que haviam sido estudados anteriormente pela técnica de imunohistoquímica, Fillmann⁸.

Os dados clínicos e anátomo-patológicos foram coletados no período de 1997 a 2003. Neste estudo, foram analisados, também, blocos de parafina de biópsias de cólon de tecido colônico, sem neoplasia colorretal (controles externos), de 15 pacientes, cujas biópsias foram realizadas de março de 2007 a março de 2008 no mesmo serviço, acima citado.

4.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo aqueles indivíduos submetidos exclusivamente a ressecções intestinais com ou sem anastomose associada, seguindo padrões oncológicos terapêuticos e não paliativos.

Os pacientes seguiram acompanhamento clínico, laboratorial e endoscópico no Serviço de Colo-Proctologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Fillmann⁸

4.5 Critérios de exclusão

- Cirurgia sem intenção curativa.
 - Outras neoplasias concomitantes ou história de tumores prévios.
 - Terapia neo-adjuvante (quimio e radioterapia).
 - Pacientes cujos dados não pudessem ser completamente revisados.
 - Impossibilidade do estadiamento clínico.
-
-

4.6 Critérios de exclusão de controles

- Pacientes com história clínica e/ou diagnóstico de adenoma ou doença inflamatória intestinal.

4.7 Variáveis do estudo

As variáveis analisadas neste estudo foram:

- Variável principal

Expressão diferencial do fator tecidual (FT) (PCR Real-Time)

- Variáveis secundárias

Grau de DMV

Idade e sexo

Ocorrência de metástases linfáticas

Localização dos tumores

4.8 Material e Método

Para análise da variável principal do estudo (Expressão do Fator Tecidual) e da variável secundária (Densidade Microvascular) foram utilizados espécimes dos tumores colorretais armazenados no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS, sob a forma de blocos de parafina.

Os dados referentes ao grau de densidade microvascular já haviam sido pesquisados, por Fillmann⁸, e foram extraídos de seu banco de dados.

Os dados referentes aos achados anátomo-patológicos foram aqueles originalmente obtidos na análise dos espécimes ressecados e utilizados para a definição do estadiamento clínico-patológico, realizado imediatamente após as intervenções cirúrgicas.⁸

Todo o material histológico em arquivo foi revisado por dois patologistas. Tais dados e materiais foram complementados com informações clínicas contidas nos prontuários médicos guardados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do HSL-PUCRS, tais como:

- Idade e sexo dos pacientes;
 - Localização dos tumores no reto ou cólon;
 - Grau de diferenciação histológica das neoplasias subdivididas em três categorias: adenocarcinomas bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados
-
-

Resultados

- Profundidade de penetração na parede intestinal, sendo os tumores agrupados em 4 categorias de acordo com o estadiamento anátomo-patológico das lesões coloretais: carcinomas invasores de submucosa; da muscular própria do intestino; da serosa ou gordura peri-intestinal; e de estruturas adjacentes;
- Metástases para cadeias linfáticas regionais do intestino;

4.8.1 Purificação do RNA total

Foram realizadas microdissecções do tecido neoplásico e de morfologia normal de cada amostra.

Previamente ao isolamento do RNA, secções de tumores incluídos em parafina foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio ótico por um patologista experiente, a fim de definir os limites da lesão.

Cada peça incluída forneceu duas amostras, uma proveniente do tecido não neoplásico e outra da lesão.

Cinco secções de 10 μ m seguintes àquela corada com hematoxilina e eosina utilizada como referência, foram obtidas e nas mesmas o tecido não comprometido (margem de segurança) do tecido neoplásico foram manualmente separados.

O RNA total foi isolado a partir dos tecidos parafinizados com o auxílio de um kit comercial (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Para tanto, 10 secções de tecido não comprometido e tecido neoplásico excisados foram separadamente incubados em

Resultados

tampão para remoção da parafina e mantidos em banho Maria, a 70°C, por 30 a 60 minutos.

Após a centrifugação, a fase líquida contendo ácidos nucleicos e proteínas foi coletada e transferida para a mini - coluna cromatográfica de afinidade a fim de eliminar remanescentes da parafina e permitir o aprisionamento do RNA.

Após sucessivas etapas de lavagem da coluna, o RNA purificado foi diluído em água livre de RNases (30 µl) a 60°C e armazenado a -80°C.

A concentração de RNA foi determinada através de plataforma fluorimétrica (QuBit®, Invitrogen, California, USA) a partir da diluição seriada de padrões de referência.

A qualidade do RNA total foi verificada através de gel de agarose desnaturante contendo formaldeído a 37% corado com SYBRGold® (Invitrogen™, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA).

Somente amostras contendo bandas definidas correspondentes ao RNA ribossomal 18s e 28s foram consideradas para análise. A pureza das amostras (relação ácido nucleico/proteína) foi determinada através de espectrofotometria, medindo a razão entre a absorbância a 260 nm 280 nm; somente amostras cujo valor apresentou-se ≥ 1.6 foram admitidas no estudo.

4.8.2 Transcrição Reversa

O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng do RNA total isolado utilizando “primers” oligoméricos (random primers), dNTPs, MgCl₂ e a enzima derivada do vírus da leucemia mielóide aviária (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Roche Molecular) em 20 µl de reação.

A mistura contendo os reagentes para transcrição reversa foi submetida a três diferentes temperaturas de aquecimento em tempos determinados no termociclador (Techne™ TC-412, Duxford, Cambridge, UK): 25°C por 10 min, 48°C por 30 min e 95°C por 5 min para finalizar a reação de RT-PCR. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

A seguir foi realizada a pré-amplificação, a mesma visou compensar as quantidades reduzidas de mRNA obtidos por purificação de amostras de secções de tecidos incluídos em parafina.

A mesma inclui uma etapa prévia de amplificação usando o pool de primers/sonda para os genes alvo (TF e GAPDH - gliceraldeído fosfato desidrogenase humana).

A pré – amplificação foi realizada através de um kit comercial (*Taq Man Preamp Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

A reação foi realizada através do protocolo proposto pelo fabricante. Os produtos finais foram armazenados a -20°C para posterior análise em tempo real.

4.8.3 PCR quantitativo baseado em fluorescência

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à fluorescência foi utilizada para estimar variações na expressão diferencial do gene de interesse.^{129,130} Para tanto, a mistura contendo cDNA foi incubada com primers e sonda TaqMan© (Assays on Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), figura 1, para o gene do Fator Tecidual humano (TF, gene-alvo) e gliceraldeído fosfato desidrogenase humana (GAPDH, controle endógeno).

A inclusão de um controle endógeno permite a normalização dos resultados, corrigindo possíveis variações na eficiência da reação enzimática entre diferentes amostras.^{131,132,133} As amostras foram preparadas em duplicatas e, para cada amostra, tumoral ou não, amplificação do controle endógeno e do gene alvo foram conduzidas.

O tipo de quantificação escolhida para avaliar a expressão dos genes foi a quantificação relativa que se baseia na comparação da expressão dos genes de interesse de tecidos tumorais em relação a tecidos normais (calibrador), utilizando o GAPDH como controle endógeno da reação.¹³³

Para cada amostra analisada foram preparadas duplicatas contendo 25ng de cDNA, o produto resultante da transcrição reversa, e uma mistura previamente preparada contendo Universal PCR Master Mix (TaqMan®), primers e sondas com o marcador de fluorescência (TaqMan® Gene Expression Assays, Assays-on-Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), incluindo também, primers e sondas para GAPDH (controle endógeno).¹³³

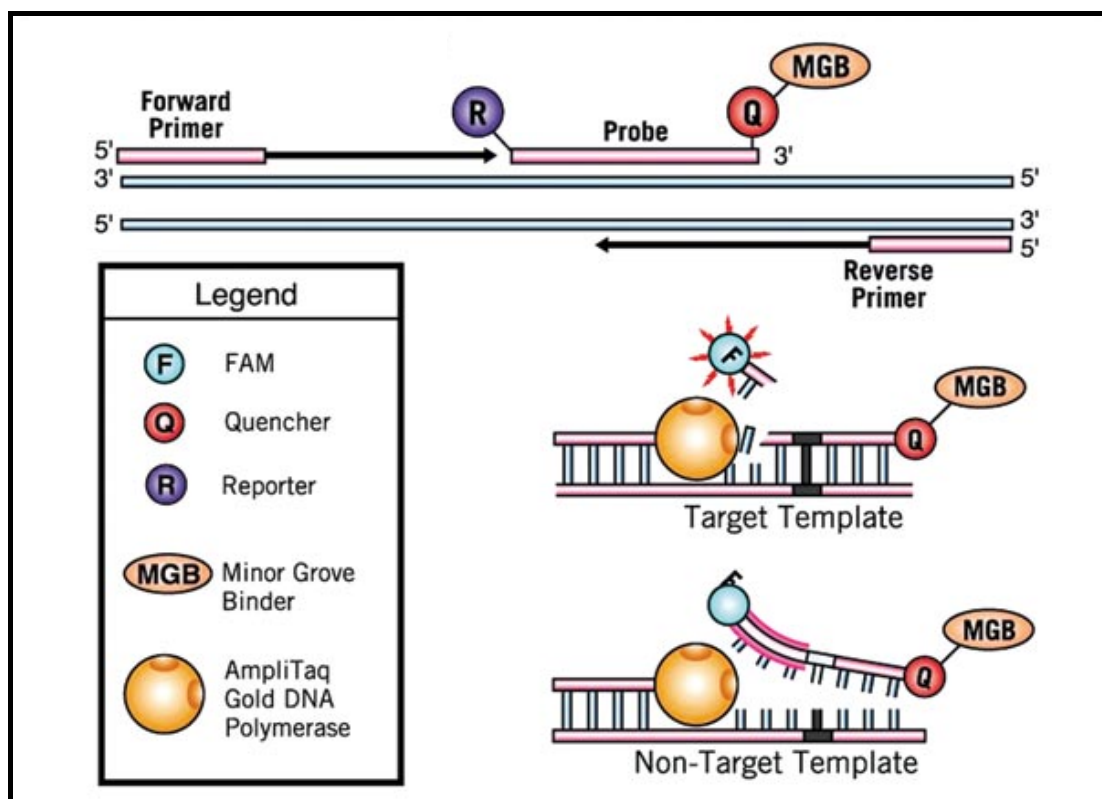


Figura 2. Análise quantitativa da expressão diferencial de genes baseada em fluorescência.

O volume final da reação para cada duplicata foi de 25µl, preparadas em placas de 96 poços. As condições de temperatura para a realização da PCR em tempo real foram divididas em quatro estágios: primeiramente, as misturas foram submetidas a uma temperatura de 30°C por 2 min, o segundo estágio foi a 95°C por 10 min, o terceiro estágio foi estabelecido em 50 ciclos a 95°C por 15s e finalmente 60°C por 1 min.

Resultados

Os ensaios foram conduzidos em termociclador (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) acoplado ao complexo de captura da fluorescência e conectado a um computador.

A validação e verificação da eficiência das reações foi conduzida através da diluição seriada (fator de diluição 10) de uma amostra de cDNA tumoral de concentração conhecida para o controle endógeno e o gene alvo.¹³³

Quando o resultado da equação de regressão para ambos os genes ficou acima de 95% a eficiência foi considerada igual. A partir desse resultado, pode-se optar por uma técnica de quantificação relativa aritmética excluindo a necessidade de padrões.¹³³

Nas análises conduzidas, a eficiência de ambos, gene alvo e controle endógeno mostraram-se adequadas (0.998 e 0.9854 respectivamente), permitindo o emprego de quantificação relativa baseada no método escolhido.¹³⁴

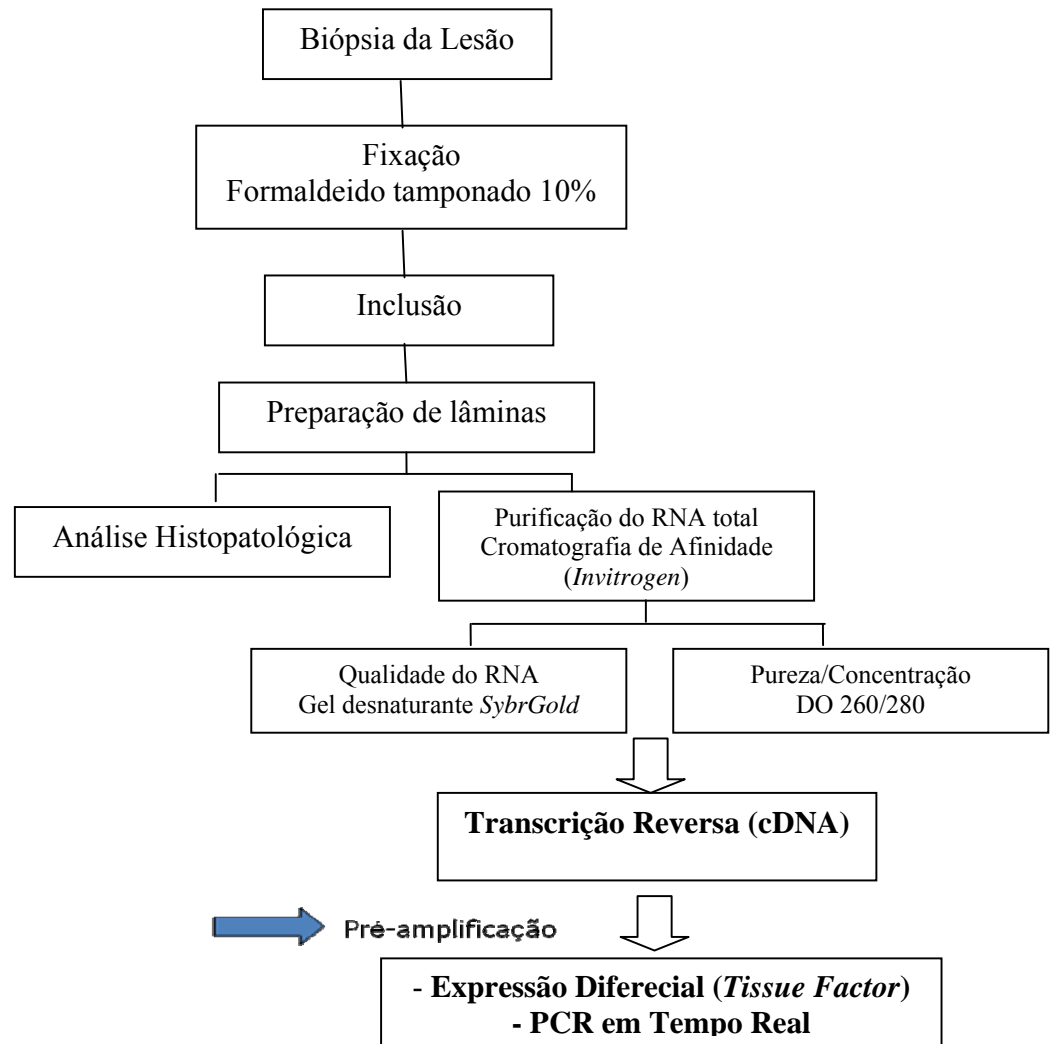


Figura 3 . Processamento e análise das amostras

4.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0.

As variáveis contínuas foram descritas através de média e desvio padrão e as variáveis categóricas foram descritas através das frequências absolutas e relativas.

Para comparar as variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados ou o teste *t-Student* ou a Análise de Variância (ANOVA) *one-way*.

Para comparar as variáveis categóricas foi aplicado o teste exato de Fisher.

Para avaliar a associação entre as variáveis contínuas, o teste da correlação linear de Pearson foi aplicado.

O intervalo com 95% de confiança foi utilizado para estimar a magnitude da diferença entre os grupos.

O nível de significância estatística considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.10 Aspectos bioéticos da pesquisa:

O presente estudo foi apresentado aos Comitês de Ética e de Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS previamente ao início da coleta dos dados, tendo obtido autorização de ambos para sua realização (Ofícios 373/08-PG e 04165/08-CEP). (Anexo 1).

Resultados

Como as análises por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (Real Time Polymerase Chain – Reaction) RT-PCR, não tiveram influência no tratamento e evolução dos pacientes vivos, foi dispensado o termo de Consentimento e preenchido o Termo de Compromisso para utilização de Dados em Projetos de Pesquisa (Anexo 2).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra estudada

A amostra foi composta por 19 pacientes com tumor, casos (48,7%) e 15 sem tumor, controles (44,1%), para avaliar a expressão diferencial do FT entre estes grupos. Destes, foram obtidos os prontuários de 10 pacientes com tumor (52,6%) e 15 controles (100 %) para a obtenção dos dados demográficos e clínicos. Na população estudada, a média de idade foi de $59,3 \pm 8,0$, sendo 5 indivíduos do sexo feminino e 5 do sexo masculino. Quanto à localização do tumor, estes se localizavam mais frequentemente no canal anal, reto e sigmóide, num total de 6 indivíduos. Em relação à presença de metástase, foram estudados 19 pacientes, casos, sendo que 17 indivíduos apresentavam metástase e 2 se encontravam sem metástase.

Resultados

As características dos dois grupos estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Caracterização da amostra

Variáveis	n	Grupo Tumor	n	Grupo Controle	P
Idade (anos) - Média ± DP	10	59,3 ± 8,0	15	55,6 ± 16,8	0,525*
Sexo – n(%)	10		15		
Masculino		5 (50,0)		4 (26,7)	0,397**
Feminino		5 (50,0)		11 (73,3)	
Localização do tumor – n(%)	10		-	-	
Canal		6 (60,0)	-	-	
anal/reto/retosigmóide					
Sigmóide e descendente		3 (30,0)	-	-	
Cólon transverso		1 (10,0)	-	-	
Metástase – n(%)	19		-	-	
Com		17 (89,5)	-	-	
Sem		2 (10,5)	-	-	

* teste t-student para amostras independentes

** teste exato de Fisher

Os dados referentes à Expressão do Fator Tecidual e Densidade Microvascular estão apresentados na Tabela 2. O grupo tumor apresentou uma expressão de FT significativamente maior do que o grupo controle ($p < 0,001$).

Tabela 2 – Distribuição da amostra quanto à expressão do Fator Tecidual e Densidade Microvascular por grupo em estudo

Variáveis	n	Grupo Tumor	n	Grupo Controle	P
Expressão do FT - Média ± DP	19	8,33 ± 3,71	15	1,00 ± 0,00	<0,001*
Mínimo – Máximo		0,17 – 15,80		1,00 – 1,00	
Densidade Microvascular - Média ± DP	17	28,9 ± 10,8	-	-	-
Mínimo – Máximo		8,65 – 46,80	-	-	

* teste t-student para amostras independentes

5.2 Expressão diferencial do Fator Tecidual

O grupo tumor teve uma expressão do Fator Tecidual, em média, 7,33 vezes maior do que o grupo controle (IC 95%: 5,65 a 9,01), conforme pode ser visualizado na Figura 4.

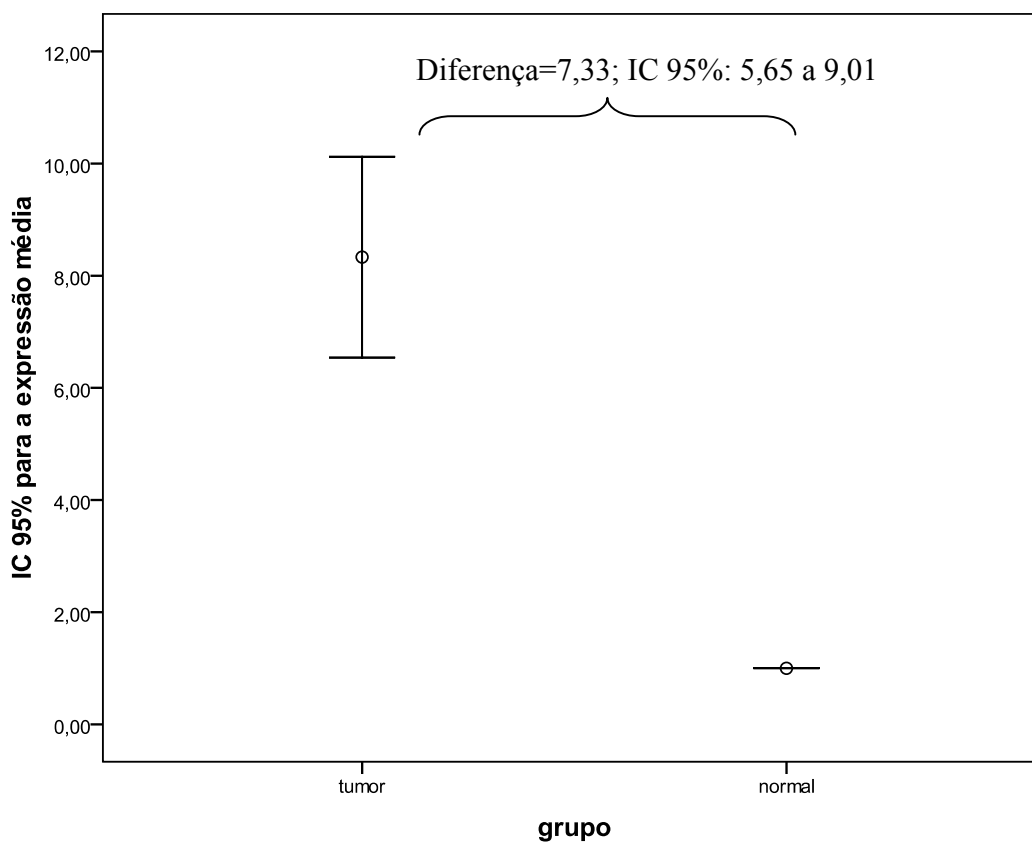


Figura 4 – Avaliação da expressão média com o intervalo de 95% de confiança conforme grupo em estudo

5.3 Relação da expressão do Fator Tecidual com o grau de Densidade microvascular

Em nossa amostra não houve associação estatisticamente significativa entre a Expressão do Fator Tecidual e a Densidade Microvascular nos pacientes com tumor ($n=17$; $r=-0,109$; $p=0,677$), conforme é apresentado na Figura 5.

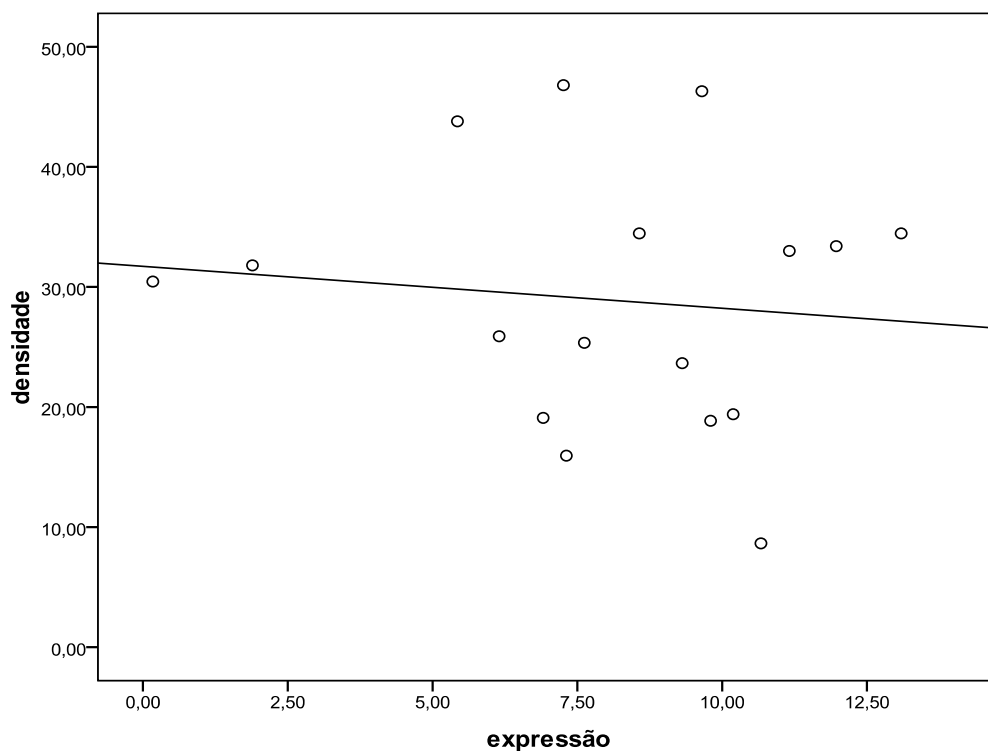


Figura 5 – Associação entre a expressão Tecidual e a densidade microvascular nos pacientes com tumor

Na amostra estudada, houve uma associação positiva, estatisticamente significativa, entre idade e Expressão do Fator Tecidual nos pacientes com tumor ($n=10$; $r=0,695$; $p=0,026$), ou seja, pacientes mais velhos tendem a apresentar maior expressão do Fator Tecidual, conforme pode ser visualizado na Figura 6.

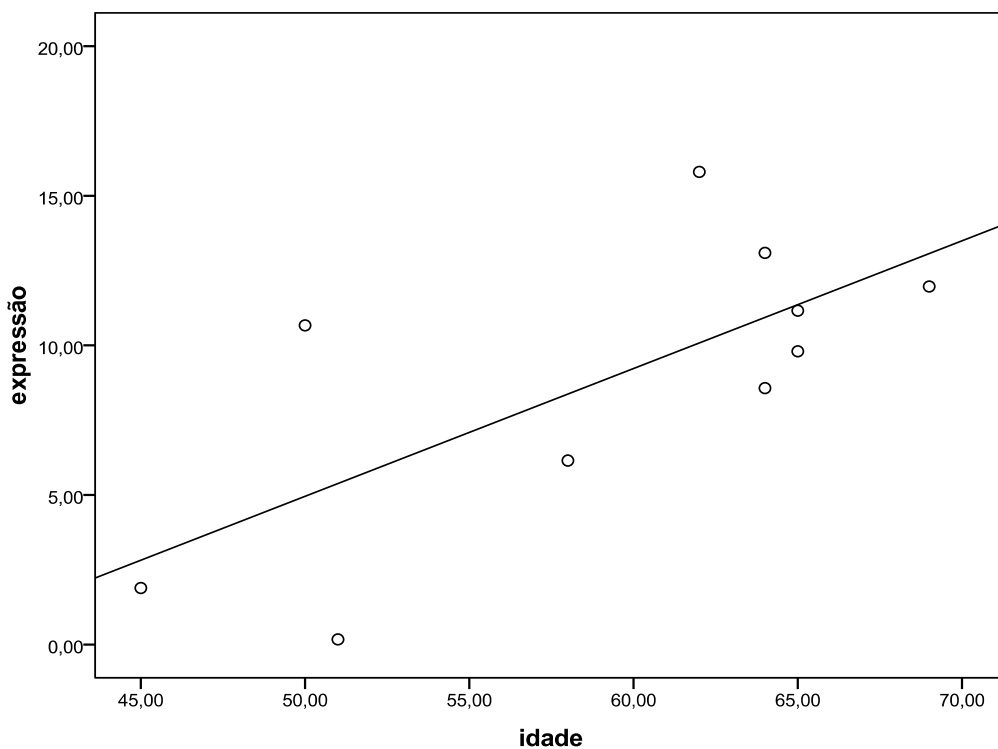


Figura 6 – Associação entre a Expressão do Fator Tecidual e a idade nos pacientes

5.4 Relação da expressão do Fator Tecidual com a presença de metástase

Houve uma associação significativa entre a expressão do fator tecidual e a presença de metástase, sendo que pacientes com metástase apresentaram expressão do Fator Tecidual significativamente maior do que os sem metástase ($p=0,001$). E este último grupo, quando comparado com o grupo controle, não apresenta diferença

Resultados

estatisticamente significativa ($p=0,978$). Não houve associação entre a Densidade microvascular e a presença de metástase ($p=0,768$).

A associação entre a expressão do Fator Tecidual e Densidade microvascular conforme sexo, localização do tumor e metástase está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da expressão do Fator Tecidual e Densidade micro vascular conforme sexo, localização do tumor e metástase no grupo de pacientes

Variáveis	N	Expressão	P	n	Densidade	P
		Média ± DP			Média ± DP	
Sexo						
Masculino	5	9,49 ± 5,93	0,741*	4	29,6 ± 7,38	0,643*
Feminino	5	8,37 ± 4,27		5	26,6 ± 10,5	
Localização do tumor						
Canal anal/reto/retosigmóide	6	7,45 ± 5,22	0,553**	6	30,5 ± 5,92	0,142**
Sigmóide e descendente	3	10,9 ± 4,83		2	17,3 ± 12,2	
Cólon transverso	1	12,0 ± 0,00		1	33,4 ± 0,00	
Metástase						
Com	17	9,19 ± 2,83	0,001*	15	28,6 ± 11,5	0,768*
Sem	2	1,03 ± 1,22		2	31,1 ± 0,95	

* teste t-student para amostras independentes

** Análise de Variância (ANOVA) *one-way*

6 DISCUSSÃO

O adenocarcinoma colorretal é uma doença que se caracteriza por apresentar altos índices de incidência e taxa de mortalidade, cuja sobrevivência pode ser considerada boa, apenas se for diagnosticada em estágio inicial.⁴

Vários aspectos já foram estudados em relação a esta doença, e muito já foi descoberto em relação a sua complexidade. Assim, a biologia molecular tem sido utilizada por vários autores que buscam respostas que possam elucidar melhor a progressão destes tumores, bem como, de outras neoplasias malignas e sua relação com o Fator Tecidual e a angiogênese.^{2, 8, 12, 18}

Desde os estudos de Folkman²⁴ que se reconhece a relevância da angiogênese no desenvolvimento dos tumores, e posteriormente pelas várias publicações que se seguiram e podem ser encontradas na literatura mundial.^{15, 94, 115, 135} Estes estudos, porém, revelam resultados controversos, seja entre os mesmos tipos de tumores ou em tumores diferentes, incluindo-se aqui o adenocarcinoma colorretal, objeto de nosso estudo.

Cabe ressaltar aqui que muitas pesquisas^{3, 6, 10} têm sido realizadas abordando a expressão imunohistoquímica do FT, mas o estudo da expressão diferencial do Fator

Discussão

Tecidual no adenocarcinoma colorretal, através do método quantitativo da Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real, até o presente momento, é inédito.

O principal achado e objeto de nosso estudo foi a associação significativa da expressão diferencial do fator tecidual (FT) do grupo tumor quando comparada com as espécimes do grupo normal, ou seja, livres de tumor. Esta expressão do FT foi em média 7,33 vezes maior no grupo tumor, do que no grupo controle.

Estes dados sugerem que a expressão do FT está presente nos tumores colorretais, o que pode nos levar a refletir em sua importância na progressão dos tumores. Isso nos permite pensar em maneiras de interferir neste processo, com a finalidade de diminuir seu efeito sobre a progressão das neoplasias colorretais.

Concordamos com outros estudos, que o FT desempenha um papel fundamental na fisiopatologia do câncer devido a sua habilidade de estimular a produção de vasos sanguíneos, e através dele criar uma proliferação vascular tumoral exagerada, muitas vezes relacionado a um pior prognóstico oncológico em diversos tipos de lesões malignas.^{17,59,65,91,94,106,108, 136}

O aperfeiçoamento dos métodos científicos possibilitou aos pesquisadores identificarem elementos da coagulação relacionados ao câncer.⁸

Provavelmente, os mecanismos que levam a esta interação envolvem alteração direta da cascata de coagulação, através de células neoplásicas circulantes na corrente sanguínea, um evento relacionado aos estados de hipercoagulabilidade observado em pacientes com câncer.

Outro fato a ser observado constitui a ativação de fatores de coagulação em sítios extravasculares em tumores malignos. E, por último, pela indução da produção de fatores relacionados à coagulação sanguínea por células inflamatórias recrutadas pelo hospedeiro.⁹⁴ Este seria um dos motivos pelos quais, pacientes com doenças inflamatórias crônicas de cólon apresentam maior risco de desenvolver câncer colorretal.¹³⁷

Entendemos que o estudo do FT, pela sua importância já tantas vezes discutida, deva ser continuado. Assim, sugerimos que outros estudos envolvendo o FT e o Adenocarcinoma colorretal sejam realizados por Reação em Cadeia de Polimerase.

Em nosso estudo, houve uma associação significativa da expressão do fator tecidual com a presença de metástase, sendo que pacientes com metástases presentes apresentaram expressão do fator tecidual significativamente maior do que o grupo sem metástase.

Os achados referidos a cima, são importantes porque sugerem que o fator tecidual pode ser um mecanismo de produção de metástases. Sua identificação na presença de tumores poderia contribuir para a elucidação da evolução do câncer colorretal.

A ativação de elementos da cascata de coagulação mediada pelo complexo FT/FVT/a levaria ao encapsulamento de células neoplásicas por fibrina e plaquetas, o que poderia estar relacionado a disseminação sistêmica e formação de metástases.¹³⁸

Mousa e colaboradores,¹⁰⁹ demonstraram a ação antiangiogênica da tinzaparina, um derivado de baixo peso molecular da heparina, em estudo “in vitro” em cobaias. Ao

Discussão

utilizarem a tinzaparina para provocar bloqueio angiogênico em células de adenocarcinoma de cólon, implantadas na membrana corioalantóide de embriões de galinha. Para os autores o mecanismo de ação parece envolver a ativação intracelular do “inibidor da rota do fator tecidual” (Tissue Factor pathway inhibitor “TFPI”).

Este mecanismo pode ter aplicação em humanos.⁸ Entendemos que tal fato poderia ajudar na decisão de planos de tratamento, incluindo terapia anti-angiogênica possibilitando o monitoramento da resposta terapêutica em adenocarcinoma colorretal.

Corroborando os nossos achados, outros pesquisadores chegaram aos mesmos resultados. Wang e colaboradores⁵² encontraram associação do FT com a presença de doença metastática ao estudarem neoplasia de ovário. Yu JL,¹¹² também encontraram associação do Fator Tecidual com a presença de metástases no fígado e linfáticas ao estudarem pacientes com neoplasia de cólon.

Seto e colaboradores¹¹⁶ estudando carcinomas colorretais, encontraram associação do FT com a presença de metástase. Os autores consideraram que o FT e o estadiamento seriam fatores prognósticos independentes.

Kaido e colaboradores¹²⁶ encontraram maior expressão do FT ao pesquisarem carcinoma hepato-celular em pacientes com metástases e com fenômenos tromboembólicos.

Akashi e colaboradores¹²⁷ também encontraram associação entre a forte expressão do FT com doença metastática em adenocarcinoma de próstata.

Discussão

Versteeg e colaboradores¹³⁹ encontraram maior expressão do FT em pacientes com doença metastática. Em contrapartida, outros estudos não encontraram associação na expressão do FT com a doença metastática.

Existem poucas pesquisas que associaram a presença do FT com a doença metastática. Por outro lado, a literatura demonstra que a associação do FT com a doença metastática foi identificada na grande maioria em pacientes com adenocarcinomas,⁵ o que vem ao encontro de nossos achados.

A angiogênese tumoral e a disseminação de metástases resultante, são eventos multifatoriais que dependem de um balanço estrito entre os agentes pró e anti angiogênicos.⁷⁴

Em nossa casuística, não houve uma associação estatisticamente significativa entre a expressão do Fator Tecidual e a Densidade Microvascular, fato este interessante, uma vez que a expressão do FT foi significativa.

Outros estudos também não encontraram associação entre a expressão do FT com a DMV, embora em suas pesquisas tenham utilizado o método de imunoistoquímica para quantificar a expressão do Fator Tecidual e outros tipos de tumores, que não o adenocarcinoma colorretal.^{5,7,91,119,136}

É relevante mencionar que os métodos de avaliação da Densidade Microvascular estão baseados principalmente em hot-spots⁶⁶ e análise morfométrica, sendo talvez pouco sensíveis para detectar diferenças entre grupos.

Seto e colaboradores¹¹⁶ não encontraram relação do FT com a presença aumentada do VEGF, o que os levou a pensar na possibilidade de que outros

Discussão

mecanismos estejam presentes tanto para aumentar a progressão dos tumores quanto para estimular a produção de vasos sanguíneos. Para os autores, um limitante dos resultados pode ter sido o fato de que não pesquisaram a DMV.

De acordo com nossos achados, também acreditamos que o Fator Tecidual parece participar da progressão das neoplasias, não apenas por mecanismos relacionados a cascata de coagulação, mas também através de um sistema de sinalização intracelular que não depende diretamente da cascata de coagulação sanguínea.^{17,94, 113,115,140}

Diante de tal afirmativa, podemos pensar que o FT tem potencial como prognóstico e preditor marcador para câncer colorretal em determinadas situações que não envolva somente a contagem de vasos, o que poderia explicar as nossas evidências em relação à DMV, apesar do número reduzido de nossa amostra.

Embora este não fosse nosso objetivo principal, entendemos que se torna imperativo o aprofundamento do estudo da expressão do FT relacionada com a DMV através do método da (RT - PCR) e, provavelmente o desenvolvimento de novas metodologias para avaliação da DMV.

Outra variável clínica e anatomo-patológica, além da presença de metástase, que apresentou uma associação significativamente positiva com a alta expressão do fator tecidual, foi a média de idade dos pacientes. Conforme a Figura 6, quanto maior a idade maior a expressão do FT.

Fillmann⁸ encontrou associação entre a expressão do FT e a idade mais avançada. Porém, o autor diz ser este o primeiro estudo a identificar esta associação. Talvez isto explique o fato de que este foi o único estudo que encontramos que

Discussão

apresentou evidências semelhantes as nossas, embora outros estudos tenham relacionado a sobrevida dos pacientes com a idade dos mesmos.^{32,35,39,141}

Acreditamos que a idade possa ter sido um achado ao acaso. Porém, este fato deve ser investigado mais profundamente, pois outros fatores podem estar envolvidos nesta relação que não apenas outras doenças concomitantes, embora saibamos que elas podem acometer pessoas em idade mais avançada.

Violi,¹⁴¹ ao estudar 1256 casos de câncer colorretal encontrou que o número de óbitos foi maior no grupo de maior idade. Porém, o autor coloca que tal fato ocorreu devido a maior frequência de patologias concomitantes nas faixas etárias mais elevadas.

Seto e colaboradores¹¹⁶ observaram que pacientes com lesões com baixa expressão do FT tinham uma média de idade menor do que os que expressavam intensamente a proteína. No entanto, esta diferença não apresentou resultados estatisticamente significativos.

Lindmark,³² em sua pesquisa composta por 212 casos de câncer colorretal, ao relacionar a idade e o prognóstico dos pacientes, encontrou associação entre a idade e um pior prognóstico. Arbman e colaboradores,³⁵ não encontraram relação entre a idade e sobrevida dos pacientes de seu estudo.

Sugerimos que outros estudos sejam realizados, talvez aumentando o número de pacientes e, diversificando a faixa etária dos mesmos, embora a relação entre a idade dos pacientes e o sucesso do tratamento tenha se mostrado de pouco valor prognóstico na literatura.

Nosso estudo não apresentou diferença significativa entre o sexo dos pacientes e a expressão do FT, embora nossa amostra tenha sido composta por um número igual de pacientes para cada sexo, este não parece ter sido um fator desfavorável ao achado, porque encontramos resultados semelhantes aos descritos na maioria dos trabalhos relatados na literatura.

Em relação à localização do tumor, tínhamos um número reduzido de pacientes em cada categoria, fato este que poderia comprometer a análise estatística, optou-se então, por agrupar a localização das lesões, conforme pode ser visualizado na tabela 3. Porém, mesmo após termos feito o ajuste, não se observou diferença significativa em relação a expressão do FT e a localização dos tumores.

Observamos que o local mais prevalente do câncer colorretal foi o canal anal, reto e sigmóide, o local isolado mais prevalente foi o reto. A literatura confirma nossos achados, de que o local mais prevalente da doença é o reto.^{8,30,40}

CONCLUSÕES

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

1. A expressão do fator tecidual foi significativamente maior no grupo tumor, quando comparada ao grupo controle.
2. Houve associação significativa entre a presença de metástase e a expressão aumentada do FT. Entretanto, não encontramos associação entre a expressão do Fator Tecidual e a Densidade microvascular.
3. Encontramos uma associação positiva, estatisticamente significativa, entre a idade e expressão do FT nos pacientes com tumor
4. Não encontramos relação entre a localização dos tumores e a expressão do FT, bem como em relação ao sexo dos pacientes da amostra.

Em conclusão, a expressão diferencial do Fator tecidual do grupo tumor foi significativamente mais alta do que no grupo controle. Apresentou ainda uma associação positiva com a idade mais elevada dos pacientes e com a presença de metástases.

PERSPECTIVAS DE NOVOS ESTUDOS

- Expandir o estudo pelo mesmo método com outros marcadores
 - Dosagem sérica de TF
 - Implementação de estudo clínico com drogas anti-angiogênicas
 - Explorar novas possibilidades de avaliação quantitativa de DMV
-
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sundlisaeter E; Gro V R; Jens K H; Per O S; Bjart A; Aly D; Karl S. Increased lymphatic vascular density is seen before colorectal cancers reach stage II and growth factor FGF – 2 is downregulated in tumor tissue compared with normal mucosa. Journal compilation. 2009 APMIS DOI 10.1111j.16000 – 0463. 2008.00025.x.
 2. Bromer M Q; Weinberg DS. Screening for colorectal cancer – Now and the Near Future. *Semin Oncol*, 2005; 32: 3 – 10.
 3. Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LAG, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1407-27.
 4. Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2010. [http:// www.inca.org.br](http://www.inca.org.br), setembro de 2010.
 5. Maahs GS. Estudo do fator tecidual e da densidade microvascular como fatores preditivos de metástases ganglionares e de óbito nos carcinomas epidermóides da cavidade oral (tese). Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
 6. Dornelles EJM. Estudo imunoistoquímico da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular em espécimes de ressecção endoscópica de carcinoma urotelial de bexiga (tese). Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
 7. Maciel EO, Análise da expressão imunoistoquímica do Fator tecidual no tumor de Wilms e sua relação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos(tese).
-

Referências Bibliográficas

- Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2007.
8. Fillmann, L.S. A expressão do Fator Tecidual no adenocarcinoma colo-retal; Relação com angiogênese e aspectos clínicos – patológicos. (Tese). Porto Alegre: PUCRS; 2006.
 9. Toneto MG. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular no carcinoma gástrico: correlação com fatores prognósticos e sobrevida (tese). Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.
 10. Gupta, Zang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Post grad. Med. J.* 2005; 81: 236-42.
 11. Nakagawa S, Nishimaki T, Suzuki T, Kanda T, Kuwabara S, Hatakeyama K. Tumor angiogenesis as an independent prognostic factor after extended radical esophagectomy for invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Surgery* 2001;129(3):302-8.
 12. Carvalhal GF. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator tecidual no câncer de próstata em humanos: correlação com angiogênese e aspectos clinicopatológicos (tese). São Paulo: SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001. 142p.
 13. Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M. Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2000; 26 (1): 44-9.
 14. Koomagi, R, Volm M. Tissue factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J. Cancer* 1998;79:19-22.
 15. Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg.* 1995;82(8): 1101 - 4.
-

Referências Bibliográficas

16. Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (18): 8205 - 9.
 17. 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;4(7):769-72.
 18. Chung FY, Huang MY, Yeh CS, Chang HJ, Cheng TL, Yen LC, Wang JY, Lin SR. GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2009 jul 20; 9 (1): 241.
 19. Chen L, Zhu YY, Zhang XJ, Wang GL, Li XY, He S, Zhang JB, Zhu JW. TSPAN1 protein expression: A significant prognostic indicator for patients with colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009 May 14; 15(18): 2270-6.
 20. Ballian N, Liu SH, Brunnicardi FC. Transcription factor PDX-1 in human colorectal adenocarcinoma: a potential tumor marker? *World J Gastroenterol*, 2008 Oct 14;14(38):5823-6.
 21. Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerrutti R, Bertoni F, Kwee I, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C. *Hum Pathol*. 2008 Oct; 39(10):1483-94. Epub 2008 jul 11.
 22. Cao J, Tang M, Li WL, Xie J, Du H, Tang WB, Wang H, Chen XW, Xiao H, Li Y. Upregulation of activator protein – 4 in human colorectal cancer with metastasis. *Int J Surg Pathol*. 2009 Feb; 17(1):16-21.
 23. Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, Mori M. *Ann Surg Oncol*. 2008 May; 15(5): Epub 2008 Feb 8.
 24. Habr-Gama A. Câncer colorretal- A importância de sua prevenção. *Arq Gastroenterol* 2005;42(1):2-3.
 25. Neves FJ, Mattos IE, Koifman RJ. Mortalidade por câncer de cólon e reto nas capitais brasileiras no período 1980-1997. *Arq Gastroenterol* 2005;42(1): 63-70.
-

Referências Bibliográficas

26. Tomislaw D, Vassiliki L T. Colon Cancer, Adenocar, e Medicine Specialities. Carcinomas of the Gastrointestinal Tract. 2009.
 27. Toyoda Y, Nakayamat, Ito Y, Ioka A, Tsukuma H. Trends in colorectal Cancer Incidence by Subsite in Osaka, Japan. Japanese Journal of Clinical Oncology 2009 39 (3) : 189 – 91.
 28. Philips R, Hittinger R, Blesovsky L. Large bowel cancer: surgical pathology and its relationship to survival. Br J Surg 1984;71:604-17.
 29. Ying Y H, Shoo H, Yang Z, Wei D Q, Yuan S, Yun S T, Xiong Z Z. Stage and histological grade of gastrointestinal Stromal tumors based on a new approach are Strongly associated with clinical behaviors. 22, 556 -569; doi: 10. 1038 / modpathol. 2009.11; publicado on line 27 february 2009.
 30. Green FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC cancer staging manual. Springer, New York, 6th edition 2002.
 31. Sobin D H; Wittekind CH. TNM classification of malignant tumors, 6 th ed. New York : Willey – Liss, 2002.
 32. Lindmark G, Gerdin B, Pahlman L, Bergström R, Glimelius B. Prognostic predictors in colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1994;37:1219-27.
 33. Shen S S; Haupt BX; Ro JY; Zhu J, Bailey HR; Schwartz M R. Number of lymph nodes examined and associated clinicopatologic factors in colorectal carcinoma. Arch Pathol Lab Med; 135(5) : 781 – 6, 2009.
 34. Weitz J, Kooch M, Debus J, Hohler T, Galle PR., B uchler MW. Colorectal Cancer. Lancet. 2005. Jan 8-14; 365(9454) : 153 - 65.
 35. Arbman G, Nilsson E, Störger-Fordell V, Sjö Dahl R. Outcome of surgery for colorectal cancer in a defined population in Sweden from 1984 to 1986. Dis Colon Rectum 1995;38:645-50.
-

Referências Bibliográficas

36. Hotokezaka M, Jimi S, Matsumoto S, Takeda S, Iwamurat T, Chijiwa K. Outcomes of Sugery for colorectal Cancer in patients of age advanced over ninety 2004; 65(7): 1745 - 9.
 37. Dy GK, Hobday TJ, Nelson G, Windschitl HE, O'Connell MJ, Alberts SR, Goldberg RM, Nikceovich DA, Sargent DJ. Long-term survivors of metastatic colorectal cancer treated with systemic chemotherapy alone: a North Central Cancer Treatment Group review of 3811 patients, NO144. Clin Colorectal Cancer, 2009 Apr; 8(2): 88-93.
 38. Andereggen E, Riss F, Gervaz P, Buscher P, Morelp. Outcome of surgery for rectal cancer in octogenarians. Swiss Med Wkly 2006; 136 : 185 -8.
 39. Whittle J, Steiberg E, Anderson G, Herbert R. Results of colectomy in elderly patients with colon cancer, based on medicare claims data. Am J Surg 1992;163:572-6.
 40. Eisenberg B, Decosse J, Harford F. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. Cancer 1982;49:1131-4.
 41. Steinberg S, Barkin J, Kaplan R, Stablein D. Prognostic indicators of colon tumors: the gastrointestinal tumor study group experience. Cancer 1986;57:1866-70.
 42. Derwing K, Gustavsson B. A study of lymph node ratio in stage IV colorectal cancer. World Journal of Surgical Oncolgy. 2008, 6: 127 doi: 10.1186/1477-7819-6- 127.
 43. Matsuda T, Saito Y, Fujii T, Uraoka T, Nakajima T, Kobayashi N, Emura F, Ono A, Shimoda T, Ikematsu H, Fu KI, Sano Y, Fujimoro T. Sze does not etermine he grade of malnancy of early invasive colorectal. Word J Gastroenterol. 2009 jun 14; 15(22): 2708 -13.
 44. Clodoaldo, H F, Bromberg, H S, Barreto E, Godoy, A C, Mattosinho- França, L C. Valor prognóstico do grau de diferenciação celular, da presença de muco e do
-

Referências Bibliográficas

- padrão de crescimento da margem invasiva em adenocarcinomas colorretais
Dukes B. *Arq Gastroenterol* 2004 jul./set;41(3).
45. Antié A, Kalezie V, Kecmanovic D, Petrovic M, Matie S, Pavlov M, Ceranie M, Trivic A, Milovic V. Influence of tumor size and intestinal wall invasion on development of colorectal liver metastases. *Acta Chir Iugosl.* 2008; 55(4): 27-30.
 46. Wolmark N, Cruz I, Redmond C, Fisher B, Fisher E. Tumor size and regional lymph node metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1983;51:1315-22.
 47. Ishibashi K, Sobajima J, Ohsawa T, Okada N, Yokoyama M, Mitsuhashi T, Miyazaki T, Nakada H, Gonda T, Ishida H. Relationship between the size and metastasis of hepatic lymph nodes in patients with synchronous liver metastasis of colorectal cancer. *Gn To Kagaku Ryoho.* 2007 nov; 34(12): 2035-7.
 48. Bodingbauer, M, Tamandl D, Schimid K, Plank C, Schima W, Gruenberger T. Size of surgical margin does not influence recurrence rates after curative liver resection for colorectal cancer liver metastases. *Br J Surg.* 2007 sep;94(9): 1133-8.
 49. Talbot I, Ritchie S, Leighton M. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. *Br J Surg* 1980;67:439-42.
 50. Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1997;77(1): 253-60.
 51. Minsky B, Mies C, Retch A. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum: II. The influence of blood vessel invasion. *Cancer* 1988;61:1417-24.
 52. Wang HL, Deng CS, Lin J, Pan DY, Zou ZY, Zhou XY. Expression of angiopoietin – 2 is correlated with vascularization and tumor size in human colorectal adenocarcinoma. *Tokoku J Exp MED.* 2007 Sep; 213(1):33-40.
 53. Shirouzu K, Isomoto H, Morimatsu M. A prospective clinicopathologic study of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg* 1991;162:216-20.
-

Referências Bibliográficas

54. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other disease. *Nature*. 2000; 407 (6801) 249 -57.
 55. Folkman J. What is the evidence that tumour are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(1) : 4-6.
 56. Streeter E H, Harris A L. Angiogenesis in bladder cancer - prognostic marker and target for future therapy. *Surg Oncol* 2002; 11 : 85 - 100.
 57. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 6(16):15-8.
 58. Folkman J. Tumor angiogenesis : Therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285 (21): 1182 - 6.
 59. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and near future. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):505-15.
 60. 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; 223:1296-9.
 61. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
 62. Lieken S, De Cler cqE, Neyts J. Angiogenesis regulators and clinical applications. *BIOCHEN Pharmacol*. 2001; 12: 89 - 94.
 63. Dassoulas K, Gazouli M, Rizos S, Theodoropoulos G, Christoni Z, Nikiteas N, Karakitsos P. Common Polymorphisms in the Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Colorectal Cancer Development(Prognosis) and Survival. *Molecular Carcinogenesis*, 48 – 563 – 569.
 64. Bohem - Viswanathan T. Is angiogenesis inhibition the holy Grail of cancer therapy? *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 89 -94.
-

Referências Bibliográficas

65. Kim J G, Chae YS, Sohn SK, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14 : 62 -6.
 66. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
 67. Vermeulen P B, 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. *EURJ Cancer* 2002; 38: 1564 - 79.
 68. Cantu De Leon D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gomez C, De La Garza Salazar J. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13(6):856-62.
 69. Garcia de la Torre N, Buley I, Wass JA, Jackson DG, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in parathyroid proliferative lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2890-6.
 70. Brieger J, Bedavanija A, Lehr HA, Maurer J, Mann WJ. Expression of angiogenic growth factors in acoustic neurinoma. *Acta Otolaryngol* 2003;123(9):1040-5.
 71. Nayha V, Viitanen T, Stenback F. Altered extent, pattern and characteristics of microvascular density are indicators of neoplastic progression in the endometrium. *Int J Cancer* 2005;115(6):975-80.
 72. Sonmezer M, Gungor M, Ensari A, Ortac F. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: in association with transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14(1):82-8.
 73. 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.
-

Referências Bibliográficas

74. Chung Y S, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumours Eur J Can 1996, 32(12) : 1501 - 5.
 75. 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.
 76. Tsujitani S, Saito H, Maeta Y, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, Kaibara N. Neoangiogenesis in patients with gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. Anticancer Res 2004; 24(3b):1853-9.
 77. Tan G, Cioc AM, Perez-Montiel D, Ellison EC, Frankel WL. Microvascular density does not correlate with histopathology and outcome in neuroendocrine tumors of the pancreas. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004;12(1):31-5.
 78. Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2005;4(2):220-6.
 79. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 1994;37:921-6.
 80. Choi; JY, Jang K. Shim Y. et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in esophageal squamous cell carcinoma: Comparison with positron emission tomography. Annals of surgical oncology. 2006; 13 (8): 1054-62.
 81. Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in gastric cancer development, prognosis, and survival. J Surg Oncol 2006; 94: 624-30.
 82. Tanigawa N, Amaya H, Matsunura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. Cancer Res 1997;57:1043-6.
-

Referências Bibliográficas

- 83.** Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2003;64(1):61-73.
 - 84.** Tarta C, da Silva VD, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Neto CC, 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.
 - 85.** Banner BF, Whitehouse R, Backer SP, Swanson RS. Tumor angiogenesis in stage 2 colorectal carcinoma: association with survival. *Am J Clin Pathol* 1998;109:733-7.
 - 86.** Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:461-6.
 - 87.** Cianchi F, Palomba A, Messerini L, Boddi V, Asirelli G, Perigli G, Bechi P, Taddei A, Pucciani F, Cortesini C. Tumor angiogenesis in lymph node negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(1):20-6.
 - 88.** Abdalla SA , Behzad F , Bsharah S , Kumar S , Amini SK , O'Dwyer ST , Haboubi NY Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol Rep* 1999;6(4):839-42.
 - 89.** Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, Watson R, Begent RH. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol* 2005;26(1):1-8.
 - 90.** Banner DW. The factor VIIa/ Tissue factor complex. *Thromb Haemost* 1999;78:512-5.
 - 91.** Regina S, Rollin J, Bléchet C, Iochmann S, Reverdiau P, Gruel Y. Tissue factor expression in non-small cell lung cancer: relationship with vascular endothelial
-

Referências Bibliográficas

- growth factor expression, microvascular density, and K- ras mutation. *J Thorac Oncol*, 2008 jul; 3(7): 689 - 97.
- 92.** Ribeiro FS, Simão TA, Amoêdo ND, Andreollo NA, Lopes LR, Acatauassu R, Rumjanek FD, Albano RM, Pinto LF, Monteiro RQ. Evidence for increased expression of tissue factor and protease – activated receptor – 1 in human esophageal câncer. *Oncol Rep*, 2009 jun; 21(6): 1599-604.
- 93.** Carmeliet P, Collen D Mackman N, Moons L, Luther T, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development.. *Nature* 1996;383:73-5.
- 94.** Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin and cancer. *Chest* 2003;124:58S-68S.
- 95.** Toshi V, Gallo R, Fallon JT, Gertz SD, Fenandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95:594-9.
- 96.** Jang Y, Guzman M, Lincoff M, Gotssauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezban M, Ellis SG, Topol EJ. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995;92:3041-50.
- 97.** Poitevin S, Garnotel R, Antonicelli F, Gillery P, Nguyen P. Type I collagen induces tissue factor expression and matrix metalloproteinase 9 production in human primary monocytes through a redox – sensitive pathway. *J Thomb Haemost*, 2008 Sep;6(9): 1586-94. Epub 2008 jun 6.
- 98.** Szotowski B, Antoniak S, Goldin- Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, Bogdanov VY, Borchert HH, Schultheiss HP, Rauch U. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovas RES*. 2007 Mar 1;73(4):806-12. Epub 2006 Dec 30.
-

Referências Bibliográficas

- 99.** Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol* 2001; 106:6-12.
- 100.** Prandoni P, Lensing AW, Buller HR. Deep vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 1992;327:1128-33.
- 101.** Goad KE, Gralnick HR. Coagulation disorders in cancer. *Hematology/oncology Clinics of North America* 1996;10(2):457-62.
- 102.** Sawada M, Myiake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, Yoshizawa Y. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer* 1999;79:472-7
- 103.** Guan M, Jin J, Su B. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* 2002;35:321-5.
- 104.** Ueno T, Toi M, Koike M. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000;83:164-70.
- 105.** Ueda C, Hiroata Y, Kihara Y. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol* 2001;36: 848-50.
- 106.** Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *EJSO* 2003;29: 417-22.
- 107.** Abdulkadir AS, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000;31(4):443-7.
- 108.** Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Med* 1996;2:167-8.
- 109.** Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):31-44.
- 110.** Amirhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP, Siddiqui FA, Sherman P, Francis JL. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced
-

Referências Bibliográficas

- upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998;80:598-602.
- 111.** Olivier V, Chabbat J, Herbert JM. 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; 20:1374-81.
- 112.** 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.
- 113.** Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk JP, Rote WE, Green SJ, Pribluda VS. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Research* 2003;63:2997-3000.
- 114.** Abe K, Shoji M, Chen J, Bierhaus A, Danave I, Micko C, Casper K, Dillehay D, Nawroth PP, Rickles F. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8363-8.
- 115.** Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998;101(7):1372-8.
- 116.** Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arai S, Imamura M. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:295-301.
- 117.** Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002;69(4):247-54.
-

Referências Bibliográficas

- 118.**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.
- 119.**Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996;56:5063-70.
- 120.**Kato S, Pinto M, Carvajal A, Espinoza N, Monso C, Sadarangani A, Villalon M, Brosens JJ, White JO, Richer JK, Horwitz KB, Owen GI. Progesterone increases tissue factor gene expression, procoagulant activity, and invasion in the breast cancer cell line ZR-75-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):1181-8.
- 121.**Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996;77:1877-83.
- 122.**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.
- 123.**Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2531-9.
- 124.**Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol* 2004;5(11):655-63.
- 125.**Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(14):5339-45.
- 126.**Kaido T, Oe H, Yoshikawa A, Mori A, Arii S, Imamura M. Tissue factor is a useful prognostic factor of recurrence in hepatocellular carcinoma in 5-year survivors. *Hepatology* 2005;52(6):1383-7.
-


Referências Bibliográficas

- 127.** 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.
- 128.** Wang X, Wang E, Kavanagh JJ, Freedman RS. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med* 2005; 21:3-25.
- 129.** Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol Endocrinol*, 25, 169-193.
- 130.** Wong, M.L. & Medrano, J. F. (2005). Real - Time PCR for m RNA quantitation *Biotechnology*, 39, 75-85.
- 131.** Zhong, H & Simons, J. W. (1999). Direct comparisom of GAPDH, beta-actin cyclophilin, and 28S Rrna as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia *Biochem Biophys Res Commun*, 259, 523-526.
- 132.** Livak, K. J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C(T) Method. *Methods*, 2001; 25, 402-8.
- 133.** Olsvik, P. A., Lie, K. K. Jordal, A. E. , Nielsen, T. O. & Hordvik, I. Evaluation of potential reference genes in real- time RT- PCR studies of Atlantic Salmon. *BMC Mol Biol*, 2005; 6. 21.
- 134.** Peirson, S. N. Butler, j. n. & Foster, R. G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*, 31, e 73.
- 135.** Herve MA, Buteau-Lozano, Vassy R, et al. Overexpression of vascular endothelial grwth factor 189 in breast câncer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol* 2008; 172: 167-78.
- 136.** Staton,C A; Chetwood A S A; Cameron L C; Cross S S; Brown N J; Reed M W R. The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Colorectal cancer. Gut* 2007;56: 1432. doi: 10.1136/gut.2007.125286.
-

Referências Bibliográficas

- 137.**Yassi Y; Tanaka T. Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis*: 2009; 8:10 DOI 10.4103/1477-3163.51851.
- 138.**Siegbahn A. Cellular consequences upon factor VIIa binding to tissue factor. *Haemostasis* 2000; 30(Suppl. 2):41-7.
- 139.**Versteeg H, Peppelenbosch, Spek. C. Tissue Factor signal Transduction in angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 1009 -13.
- 140.**Shoji M, Hancock WW, Abe K, 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; 152:399-411.
- 141.**Violi V, PietraN, Grattarola M, Sarli L, C Houa O, Roncoroni L, et al. Curative surgery for colorectal câncer: long-term results and life expectancy in the elderly. *Dis colon Rectum* 1998; 41 : 291 - 8.
-

ANEXOS

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 373/08-CEP

Porto Alegre, 14 de abril de 2008.

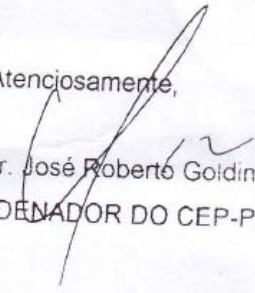
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04165, intitulado: **"Expressão do fator tecidual no adenocarcinoma colo - retal por reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT - PC)"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Vinicius Duval da Silva
N/Universidade

Anexo 2

Artigo Original

Tissue factor expression in adenocarcinoma detected by RT-PCR

Azevedo NA,¹ Batista EL Jr.,² Moreira CC,³ Fillmann L S,⁴ Lopes T G,⁵ Carvalho G F,⁴ dos Santos DS,⁵ Silva VD ^{6*}

¹ Department of FEn – University Federal of Pelotas RS Brasil

² Department clinic of Faculty Odontologia PUCRS Brasil

³ Postgraduate course in Medicine and Health Sciences PUCRS Brasil

⁴ Department of Surgical FAMED – PUCRS Brasil

⁵ Center for Molecular and Functional Biology (CP-BMF)

⁶ Department of Pathology and Radiation. FAMED – PUCRS Brasil

* Correspondence to: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, Departamento de Patologia e Radiações FAMED – PUCRS.

Av. Ipiranga, 6690, Hospital São Lucas, Bairro Partenon, CEP 90610000 Porto Alegre - RS - Brazil. e-mail: vinids@pucrs.br

Abstract

Colorectal cancer is one of the neoplasias with a growing incidence in humans. TF expression has been associated with the development of metastasis and poor prognoses in many types of tumors, and it is considered one of the most important pro-angiogenic factors. This study aimed to demonstrate the differential of TF expression in colorectal carcinomas by using the technique of quantification of nucleic acids (mRNA) by Polymerase Chain Reaction in Real Time (RT-PCR). Blocks of paraffin were studied in 19 patients with tumors (cases) and 15 without tumors (control) in the database of the Department of Colo-proctology, at the São Lucas Hospital of PUCRS, and the intensity of TF expression was compared with the Microvascular Density (DMV) and with clinical and pathological findings. The tumor group presented a TF expression greater than that of the control group ($p < 0.001$), and it had a TF expression which, on average, was 7.33 times higher than the control group. There was a significant association between the presence of metastasis and increased TF expression ($p = 0.001$), as well as between age and TF expression in patients with tumors ($p = 0.026$); however, we found no association between the expression of tissue factor and microvascular density ($p = 0.67$) related to the location of tumors and gender of the patients. In conclusion, the differential expression of tissue factor in the tumor group was significantly higher than in the control group, and it also presented a positive association with older age of patients and the presence of metastases.

Keywords: colorectal adenocarcinoma – Tissue Factor Expression – Polymerase Chain Reaction in Real Time (RT-PCR).

Introduction

Colorectal adenocarcinoma which in terms of incidence, is characterized as the third most common cancer worldwide in both sexes and the second leading cancer cause in developed countries [1,2].

TF is a cell membrane protein that is linked to setting off the chain reaction of coagulation and which appears to be essential for the progression of malignant neoplasia by activating the process of angiogenesis, and it is considered one of the most important pro-angiogenic factors. [5] Angiogenesis constitutes the process of creating new blood vessels and therefore is necessary for growth, invasion and metastasis of solid tumors [5].

TF expression has been associated with the development of metastasis and poor prognosis in many tumor types [6,7]. Apparently, TF expression provides

a higher rate of tumor growth and neovascularization that is partially mediated by the concomitant production of VEGF (growth factor of vascular endothelium) and the reduction of thrombospondin 2 [6,8].

Several studies have been developed involving molecular biology by using the method of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) [9,10,11,12,13,14], but until now there has been no information about any other study involving the quantification of tissue factor expression in colorectal cancer by using the technique of quantifying mRNA by RT-PCR, the object of our study.

Faced with the frequency and intensity of TF expression in colorectal cancer, numerous opportunities are opening up for studies, both in the evaluation of the pathophysiology of progression of tumors along with the coagulation chain reaction and also the possibility of new therapeutic approaches.

This study aimed to demonstrate the differential TF expression in colorectal adenocarcinomas and to assess the possible relation of TF with angiogenesis and with clinical and anatomical – pathological factors.

The study included only those individuals who underwent intestinal resection with or without associated anastomosis, following patterns of cancer treatment rather than palliative treatment. The patients had clinical, laboratory and endoscopy follow-up at the Department of Colo-proctology, at the São Lucas Hospital of PUCRS.

Material and Methods

The sample consisted of blocks of paraffin from 19 patients diagnosed with adenocarcinoma of the colon and rectum, from the database of the Department of Colo-proctology, at the São Lucas Hospital of PUCRS, which were previously studied by the immunohistochemistry technician and whose clinical and anatomic pathological data were collected between 1997-2003; and blocks of paraffin from biopsies of colon tissue without colorectal neoplasia (controls) of 15 patients, whose biopsies were performed from March 2007 to March 2008 in the same department.

Data on the degree of microvascular density used in this study had already been surveyed in another study [3]. Regarding the anatomical and pathological findings, they were those originally obtained in the analysis of re-dried specimens and used to define the clinical-pathological staging performed immediately after the surgery. All the histological material on file was reviewed by two pathologists. Such data and materials were supplemented with clinical information contained in medical records stored in the Service Medical Records and Statistics of the SLH-PUCRS.

The analyses done by polymerase chain reaction techniques were performed at the Research Center for Molecular and Functional Biology (CP-BMF) (TecnoPUC).

Purification of the total RNA

Manual micro-dissections were performed of the neoplastic tissue and the normal morphology of each sample. Prior to the isolation of RNA, sections of tumors embedded in paraffin were stained with hematoxylin and eosin and examined under an optical microscope by an experienced pathologist in order to define the limits of the lesion. Each piece that was included provided a sample from the lesion. Five 10 μ m sections following the one that was stained with hematoxylin and eosin used for reference

were obtained. The total RNA was isolated from paraffinized tissue with the aid of a commercial kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). To accomplish this, the five sections of excised tumor tissue were separately incubated in buffer to remove the paraffin and kept in a hot-water bath at 70°C for 30-60 minutes. After centrifugation the liquid phase containing nucleic acids and proteins was collected and transferred to affinity chromatography columns to remove remaining paraffin and allow the RNA separation. Following successive steps of washing the column, the purified RNA was diluted in water free of RNases (30 μ l) at 60°C and stored at -80°C.

The concentration of RNA was determined by a fluorimetric platform (Qubit®, Invitrogen, California, USA). The quality of the total RNA was verified by denaturing agarose gel containing 37% formaldehyde stained with SYBRGold® (Invitrogen™, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Only samples containing defined bands corresponding to ribosomal RNA 18s and 28s were considered for analysis. The purity of the samples (the nucleic acid / protein ratio) was determined by spectrophotometry, measuring the ratio of the absorbance at 260 nm / 280 nm; and only samples of which the values were ≥ 1.6 were accepted in the study.

Reverse Transcription and preamplification

The cDNA was synthesized from 50 ng of total RNA that was isolated by using oligomeric primers (random primers), dNTPs, MgCl₂, and the enzyme derived from the avian myeloid leukemia virus (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Roche Molecular) in a 20 μ l reaction. The mixture containing reagents for reverse transcription was subjected to three different heating temperatures at determined times in the thermocycler (Techne™ TC-412, Duxford, Cambridge, UK) at 25 °C for 10 min, 48 °C for 30 min and 95 °C for 5 min to finalize the reaction. Due to the low concentration of total RNA from paraffin samples and thus in the cDNA, a preamplification of the target genes was carried out with a commercial kit (TaqMan® Preamp Master Mix Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To this end, 10 μ l of the TF and GAPDH TaqMan assays were pooled and diluted 50X with TE buffer (final concentration=0.2X). Preamplification was carried out in a 50 μ l reaction volume that contained the preamplification master mix, the diluted, pooled primers-probe sets and approximately 10 ng of cDNA reverse transcribed in the previous step. The mixtures were transferred to a thermocycler and subjected to 95°C for 10 min, followed by 10 cycles of 95°C for

Table 1 – Characterization of the sample

Variables	n	Tumor Group	n	Control Group	P
Age (years) - Mean \pm DP	10	59.3 \pm 8.0	15	55.6 \pm 16.8	0.525*
Sex - n(%)	10		15		
Male		5 (50.0)		4 (26.7)	0.397**
Female		5 (50.0)		11 (73.3)	
Location of the tumor - n(%)	10		-	-	
Canal anal/rectal/rectosigmoid		6 (60.0)		-	
Sigmoid e descending		3 (30.0)		-	
Transverse Colon		1 (10.0)		-	
Metastasis - n(%)	19		-	-	
with		17 (89.5)		-	
without		2 (10.5)		-	

*t-student test for independent samples, **Fisher exact test

Table 2 – Sample distribution for Tissue Factor Expression and Microvascular Density in the study group

Variables	n	Tumor Group	n	Control Group	P
TF Expression - Mean \pm DP	19	8.33 \pm 3.71	15	1.00 \pm 0.00	<0.001*
Minimum - Maximum		0.17 - 15.80		1.00 - 1.00	
Microvascular Density - Mean \pm DP	17	28.9 \pm 10.8	-	-	-
Minimum Maximum		8.65 - 46.80		-	

*t-student test for independent samples

Table 3 – Evaluation of Tissue Factor Expression and Microvascular Density according to gender, tumor location, and metastasis in the group of patients

Variable	n	Expression Mean \pm DP	P	n	Density Mean \pm DP	P
Sex						
Male	5	9.49 \pm 5.93	0.741*	4	29.6 \pm 7.38	0.643*
Female	5	8.37 \pm 4.27		5	26.6 \pm 10.5	
Tumor location						
Canal anal/rectal/rectosigmoid	6	7.45 \pm 5.22	0.553**	6	30.5 \pm 5.92	0.142**
Sigmoid and descending	3	10.9 \pm 4.83		2	17.3 \pm 12.2	
Transverse colon	1	12.0 \pm 0.00		1	33.4 \pm 0.00	
Metastasis						
With	17	9.19 \pm 2.83	0.001*	15	28.6 \pm 11.5	0.768*
Without	2	1.03 \pm 1.22		2	31.1 \pm 0.95	

*t-student test for independent samples, ** Analysis of One-way Variance (ANOVA)

15 seconds, and 60°C for 4 minutes. The products of the preamplification reactions were stored at -20°C.

Fluorescence-based Quantitative PCR

The technology of Polymerase Chain Reaction (PCR) associated with fluorescence was used to estimate variations in the differential expression of the gene of interest. Therefore, the mixture containing cDNA was incubated with primers and TaqMan probes (Assays on Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the human Tissue Factor gene and human GAPDH as the endogenous control (Endogenous Controls, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The type of analysis chosen to evaluate gene expression was relative the quantification, which is based on the com-

parison of gene expression in tumor tissues relative to the normal tissue (calibrator), using GAPDH as an endogenous control reaction [20]. Duplicates were prepared from the analyzed samples, that contained the cDNA preamplification products further diluted 5x. The gene expression mixture contained the pre-amplification products (5 ul), a master mix containing Taq Polymerase, MgCl₂ and dNTPs, and the target genes primers and probe. TF and GAPDH were separately amplified in singleplexed fashion. The final reaction volume for each duplicate was 25µl that was prepared in 96-well plates. The analysis was carried out in a thermalcycler (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) with fluorescence resources, connected to a computer and amplified according to a

standard protocol (30 ° C for 2 min, 95 ° C for 10 min, then 50 cycles at 95 ° C for 15s and 60°C for 1 min). Validation and of the efficiency of reactions were conducted by serial dilution (dilution factor 10) of a sample of tumor cDNA of a concentration known for the endogenous control and target gene. In the analyses conducted, the efficiency of both the target and the endogenous control gene were shown to be suitable (0.998 and 0.9854 respectively), allowing the use of relative quantification based on the method [18].

Statistical analysis

Data analysis was performed by using SPSS software (Statistical Package for Social Sciences) version 17.0.

Continuous variables were described as mean and standard deviation and categorical variables were described through absolute and relative frequencies.

To compare continuous variables between groups, either the t-Student test or the Analysis of One-way Variance (ANOVA) test were used.

To compare categorical variables, the Fisher exact test was applied.

To evaluate the association between continuous variables, the Pearson linear correlation test was applied.

The interval with 95% of confidence was used to estimate the magnitude of the difference between the groups. The significance level considered was 5% ($p \leq 0.05$).

Results

The sample consisted of 19 patients with tumors (48.7%) and 15 controls without tumors (44.1%). Of these, the medical records of 10 patients with tumors (52.6%) and 15 controls (100%) we obtained in order to get the demographic and clinical data. In this population the mean age was 59.3 ± 8.0 and there were 5 female individuals and 5 male individuals. As for the location of the tumor, they were more frequently located in the anal canal, but in 6 individuals they were in the rectum and sigmoid. Regarding metastasis, 17 individuals had metastasis and 2 did not have metastasis. The characteristics of both groups are presented in Table 1.

The data for Tissue Factor Expression and Microvascular Density are presented in Table 2. The tumor group showed significantly greater tissue expression than the control group ($p < 0.001$).

Tissue Factor Expression in tumors of our sample was statistically significant. The tumor group had a tissue factor expression that was, on average, 7.33 times higher than that of the control group (95% CI 5.65 to 9.01), as can be seen in Figure 1.

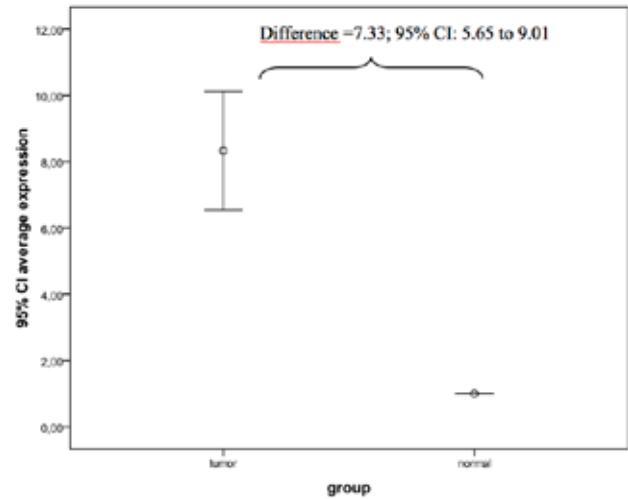


Figure 1 - Evaluation of the average expression with the range of 95% confidence according to the study group.

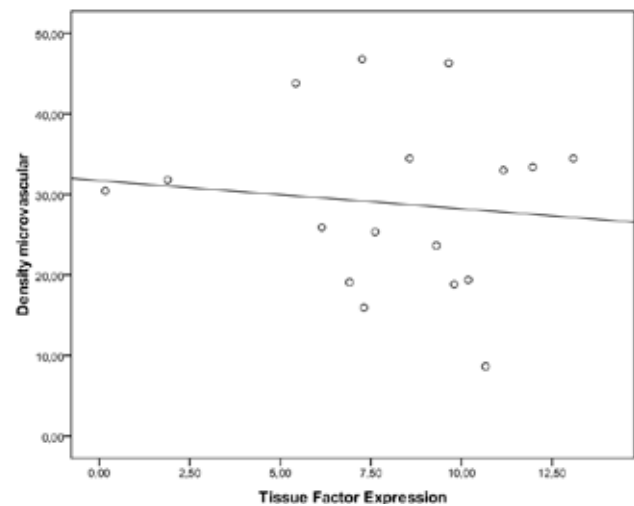


Figure 2 - Association between Tissue expression and microvascular density in patients with tumors

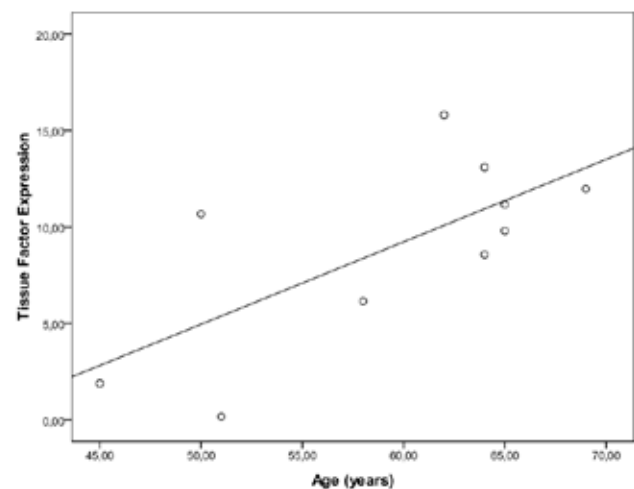


Figure 3 - Association between Tissue Factor and the age of the patients

In our sample there was no statistically significant association between Tissue Factor Expression and Microvascular Density in patients with tumors ($n = 17$, $r = -0.109$, $p = 0.677$), as is shown in Figure 2.

In our sample there was a statistically significant positive association between age and tissue factor expression in patients with tumors ($n = 10$, $r = 0.695$, $p = 0.026$), i.e., older patients tend to present higher rates of Tissue Factor Expression, as can be seen in Figure 3.

There was an association between tissue factor expression and the presence of metastasis, and patients with metastasis showed tissue factor expression that was significantly higher than that of those without metastasis ($p = 0.001$). Even the latter group, when compared with the control group, shows no statistically significant difference ($p = 0.978$). There was no association between microvascular density and the presence of metastasis ($p = 0.768$).

The association between the tissue factor expression and microvascular density according to gender, tumor location, and metastasis is presented in Table 3.

Discussion

Colorectal cancer is a disease that is characterized by having high degrees of incidence and mortality rates, and of which the survival rate is considered good only if it has been diagnosed at an early stage [23]. Molecular biology has been used by several authors who seek answers that may better elucidate the progression of these tumors as well as other types of malignant neoplasia and their relationship with tissue factor and angiogenesis.

It is fitting to point out here that several studies have been conducted addressing the immunohistochemical expression of TF [8], but the study of differential expression of tissue factor in colorectal cancer using the quantitative method of Real-time Polymerase Chain Reaction is unprecedented. The main finding and object of our study was the significant association of the differential expression of tissue factor (TF) in the tumor group when compared with specimens in the group that is normal, in other words, free of tumors. The expression of TF was on average 7.33 times greater when compared with the control group. These data suggest that TF expression is present in colorectal tumors. Several authors agree that TF plays a key role in the pathophysiology of cancer due to its ability to stimulate the production of blood vessels and thereby create an excessive proliferation

of a vascular tumor, which may often be related to poor prognosis in several cancer types of malignant lesions, this being one of the main points involved in the study of the role of tissue factor in the progression of cancer [8, 22].

In our study there was a significant association of tissue factor expression with the presence of metastasis, and patients with metastases present showed a tissue factor expression that was significantly higher than the group without metastasis. These findings are important because they suggest that tissue factor may be a partner of the production of metastases, and their identification in the presence of tumors could contribute to the elucidation of the evolution of colorectal cancer.

The activation of elements of the coagulation chain reaction that is mediated by the TF/FVT/a complex would lead to neoplastic cells being encapsulated in fibrin and platelets, which could be related to systemic dissemination and formation of metastasis [3].

The antiangiogenic action of tinzaparin, which is a low molecular weight derivative of heparin, was demonstrated in an *in vitro* study causing the blocking of angiogenesis in colon cancer cells implanted in the chorioallantoic membrane of chick embryos [24]. From the authors' viewpoint, the mechanism of the action appears to involve the intracellular activation of a "Tissue factor pathway inhibitor" (TFPI). This mechanism may have an application in humans. Other researchers reached the same results, finding an association of TF with metastatic diseases [24-25]. In contrast other studies have found no association between the TF expression and metastatic diseases. [26]

The literature demonstrates that the association between TF and metastatic disease was identified in most patients with adenocarcinoma, which is in line with our findings [25]. However, in our analysis of case studies there was not any statistically significant association between the Tissue Factor Expression and Microvascular Density. Other studies found no association between the immunohistochemical TF Expression and MVD upon researching other types of tumors [25, 27]. We agree that tissue factor appears to play a part in the progression of neoplasia, not only by mechanisms related to the chain reaction of coagulation but also through an intracellular signaling system that is not directly dependent on the chain reaction of blood coagulation but involves it nonetheless [8, 27, 28], which would explain our findings.

The average age of the patients showed a significantly positive association with tissue factor expression. We found an association between the expression of TF and old age [22] as shown in Figure 3.

We suggest that this data should be further investigated by increasing the number of patients, and by diversifying their age groups, other factors may be involved in this relationship as well as other concomitant diseases, as we know they can affect people in older age, although the relationship between patient age and treatment success has been shown to be of little prognostic value in the literature. [20].

We found no significant difference between patients' gender, the location of tumors and TF, and our results are similar to those described in the literature. The most prevalent location for colorectal cancer was the rectum, which is consistent with many other studies [1, 2, 30].

Conclusions

In conclusion, the differential tissue factor expression of the tumor group had a TF expression that on average was 7.33 times higher than the control group ($p < 0.001$). Furthermore, a positive association was shown with more advanced ages of the patients ($p = 0.026$) and with the presence of metastasis. ($P = 0.001$).

Acknowledgment

This study was supported by CNPq (MCT/CNPq 15/2007) Universal.

References

- Bromer M Q; Weinberg DS. Screening for colorectal cancer – Now and the Near Future. *Semin Oncol*, 2005; **32**: 3 – 10.
- Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LAG, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**:1407-27.
- Gamier D, Milsom C, Magnus N, Mechan B, Weitz J, Yu J. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res*. 2010 Apr; **125** Supp/2 : 544 – 50. Montreal Children's Hospital, Mc Gill University, QC, Canada.
- Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue Factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res*. 2010 Apr; **125** Suppl 2: S36-8. Department of Immunology and Microbial Science, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.
- Guptak, Zang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Post grad. Med. J*. 2005; **81**: 236 – 242.
- Nakagawa S, Nishimaki T, Suzuki T, Kanda T, Kuwabara S, Hatakeyama K. Tumor angiogenesis as an independent prognostic factor after extended radical esophagectomy for invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Surgery* 2001; **129**(3):302-8.
- Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M. Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2000; **26** (1): 44-9.
- 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; **4**(7):769-72.
- Chung FY, Huang MY, Yeh CS, Chang HJ, Cheng TL, Yen LC, Wang JY, Lin SR. GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2009 Jul 20; **9** (1): 241.
- Chen L, Zhu YY, Zhang XJ, Wang GL, Li XY, He S, Zhang JB, Zhu JW. TSPAN1 protein expression: A significant prognostic indicator for patients with colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009 May 14; **15**(18): 2270-6.
- Ballian N, Liu SH, Brunnicardi FC. Transcription factor PDX-1 in human colorectal adenocarcinoma: a potential tumor marker? *World J Gastroenterol*, 2008 Oct 14; **14**(38):5823-6.
- Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerrutti R, Bertoni F, Kwee I, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C. *Hum Pathol*. 2008 Oct; **39**(10):1483-94. Epub 2008 Jul 11.
- Cao J, Tang M, Li WL, Xie J, Du H, Tang WB, Wang H, Chen XW, Xiao H, Li Y. Upregulation of activator protein-4 in human colorectal cancer with metastasis. *Int J Surg Pathol*. 2009 Feb; **17**(1):16-21.
- Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, Mori M. *Ann Surg Oncol*. 2008 May; **15**(5): Epub 2008 Feb 8.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol Endocrinol*, **25**, 169-193.
- Wong, M.L. & Medrano, J. F. (2005). Real - Time PCR for m RNA quantitation *Biotechnology*, **39**, 75-85.
- Zhong, H & Simons, J. W. (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin cyclophilin, and 28S Rna as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia *Biochem Biophys Res Commun*, **259**, 523-526.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T) Method. *Methods*, 2001; **25**, 402-408.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K. Jordal, A. E. , Nielsen, T. O. & Hordvik, I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT- PCR studies of Atlantic Salmon. *BMC Mol Biol*, 2005; **6**, 21.
- Peirson, S. N. Butler, j. n. & Foster, R. G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*, **31**, e 73.
- National Cancer Institute - Ministry of Health of Brazil. Estimates of the incidence and cancer mortality in Brazil - 2010. (*Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*) – 2010. [http:// www.inca.org.br](http://www.inca.org.br), September 2010.
- Staton, C A; Chetwood A S A; Cameron L C; Cross S S; Brown N J; Reed M W R. The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Gut* 2007; **56**: 1432. doi: 10.1136/gut.2007.125286.
- Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; **30**(1):31-44.
- Hembrough TA, Swartz GM, Papatianassiu A, Vlasuk JP, Rote WE, Green SJ, Pribluda VS. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Research* 2003; **63**:2997-3000.
- Versteeg H, Peppelenbosch, Spek. C. Tissue Factor signal Transduction in angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2003; **24**: 1009 – 1013.
- Koomagi, R, Volm M. Tissue factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J. Cancer* 1998; **79**:19-22.
- Regina S, Rollin J, Bléchet C, Iochmann S, Reverdiau P, Gruel Y. Tissue factor expression in non-small cell lung cancer: relationship with vascular endothelial growth factor expression, microvascular density, and K- ras mutation. *J Thorac Oncol*, 2008 Jul; **3**(7): 689 – 97.
- Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin and cancer. *Chest* 2003; **124**:58S-68S.
- Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998; **101**(7):1372-8.
- Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; **69**(4):247-54.
- Green FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC cancer staging manual. Springer, New York, 6th edition 2002.