

RAIMUNDO PESSOA VIEIRA - TSBCP

## ANGIOGÊNESE E O POTENCIAL MALIGNO DO ADENOCARCINOMA COLORRETAL AVANÇADO

CLAUDIO TARTA - TSBCP  
JOSÉ CARLOS PROLLA  
PEDRO GUS - TSBCP  
CESAR CHIELE NETO - TSBCP  
V.D. SILVA  
C.R. TEIXEIRA

---

TARTA C, PROLLA JC, GUS P, NETO CC, SILVA VD & TEIXEIRA CR - Angiogênese e o potencial maligno do adenocarcinoma colorretal avançado. *Rev bras Coloproct*, 1998; 18(4): 265 - 275

---

O carcinoma colorretal é um dos tumores sólidos mais prevalentes no mundo, ocupando a terceira posição, em ambos os sexos, precedido pelo carcinoma de pulmão e estômago em homens, e pelo carcinoma de mama e cérvix em mulheres (Coleman, 1993). Apresenta ampla variação em relação à distribuição geográfica, encontrando-se a maior incidência na América do Norte e Europa Ocidental e a menor na Ásia e África - esta diferença pode ser superior a dez vezes (Boyle, 1985). Nos Estados Unidos, ocupa a quarta posição em incidência, após o carcinoma de mama, pulmão e próstata, e representa a segunda causa de mortalidade por carcinoma, atrás do carcinoma de pulmão (American Cancer Society, 1995; Engel, 1996). Neste país, em 1996, ocorreram aproximadamente 133.500 novos casos de carcinoma colorretal e 54.900 mortes (Parker, 1996). Conforme dados do Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer (1997), estimou-se, no Brasil, a ocorrência de 8.980 novos casos de câncer colorretal em homens e 8.650 em mulheres, em 1997, com uma taxa bruta de incidência (por 100.000 habitantes) de 12,38 e 11,64, respectivamente. O carcinoma colorretal está entre as cinco neoplasias mais incidentes em ambos os sexos; em relação ao número de óbitos e taxa bruta de mortalidade (por 100.000 habitantes) por câncer no Brasil, ocorridos em 1997, o câncer colorretal ocupa a quinta posição, em ambos os sexos.

O câncer colorretal apresenta sobrevida de aproximadamente 40%. Embora tenha ocorrido uma pequena elevação na sobrevida, durante as últimas décadas, na Inglaterra, esta é limitada, se comparada à sobrevida em cinco anos de 32%

para o câncer de cólon e 29% para o câncer de reto nos Estados Unidos, no período de 1940 a 1949 (Wilmink, 1997). Estes dados demonstram que houve pequeno progresso no tratamento do câncer colorretal durante as quatro últimas décadas, apesar do aprimoramento dos métodos diagnósticos, técnica cirúrgica e cuidados perioperatórios. Com as atuais opções terapêuticas, é provável que qualquer modificação significativa no prognóstico dos pacientes implique a elaboração de estratégias eficazes para o diagnóstico precoce da doença primária e recidivada e a busca de medidas eficazes para o tratamento adjuvante.

Os indicadores prognósticos no câncer colorretal incluem a diferenciação histológica, profundidade de invasão (Dukes, 1958; Wolmark, 1986) e invasão linfática (Vermeulen, 1995; Tomisaki, 1996; Minsky, 1988). A invasão linfonodal e o número destes envolvidos também são apontados como indicadores prognósticos independentes (Wolmark, 1986; Philips, 1984). Atualmente, o envolvimento linfonodal é o fator determinante mais importante na indicação de terapia adjuvante; porém, isoladamente, nem sempre indica quais pacientes encontrar-se-ão em risco de progressão da doença. Indicadores prognósticos adicionais poderiam identificar um subgrupo de pacientes com risco aumentado de recorrência e, assim, aprimorar a seleção para a terapia adjuvante (Engel, 1996). Recentemente, têm sido realizadas abordagens moleculares e imunohistoquímicas para a identificação de um novo indicador prognóstico, além dos fatores clinicopatológicos conhecidos (Chung, 1996). Entre estas, a quantificação da angiogênese e de peptídeos angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), têm demonstrado aplicação clínica na avaliação da sobrevida e recorrência.

A angiogênese é o crescimento de novos capilares (Folkman, 1971, 1990; Yamazaki, 1994). Está fisiologicamente presente durante a fase embrionária e fetal. No adulto, é usualmente ausente, restringindo-se a poucas situações onde representa uma etapa essencial, como no ciclo mensal da proliferação endometrial, na ovulação e formação do corpo lúteo, reprodução, formação da placenta e na cicatrização (Brem, 1993; Folkman,

1995, Saclarides, 1997). Nestas situações, a angiogênese é um processo ordenado, regulado e autolimitado, provavelmente como resultado do equilíbrio entre fatores estimuladores e inibidores da proliferação vascular. Quando a multiplicação vascular aumenta sem controle, a angiogênese persistente e não-controlada torna-se patológica e sustenta a progressão de muitas patologias neoplásicas e não-neoplásicas. A angiogênese associada a tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral, a partir de células endoteliais do hospedeiro (Folkman, 1971; Yamazaki, 1994; Dickinson, 1994; Brem, 1993). Isto promove o crescimento tumoral através da perfusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos, ao invés da simples difusão no espaço extracelular que mantém o tumor restrito e com uma pequena população celular (Folkman, 1971).

Folkman (1971) isolou um fator em tumores humanos e animais denominado *tumor-angiogenesis factor* ou *TAF*. É mitogênico para as células endoteliais, estimulando a rápida formação de novos capilares em animais, e não é encontrado em tecidos normais, com exceção da placenta. A partir do isolamento do *TAF* e baseando-se em suas observações anteriores, Folkman (1971) demonstrou, pioneiramente, que a angiogênese é um pré-requisito para o crescimento tumoral e não simplesmente um efeito colateral deste, estabelecendo a hipótese de que o crescimento tumoral é angiogênese-dependente: "uma vez que o tumor tenha ocorrido, cada aumento na população celular deve ser precedido pela proliferação de novos vasos capilares, convergindo ao tumor". A angiogênese determinou um novo conceito na biologia tumoral e, embora não seja completamente conhecido o mecanismo que a desencadeia, tem sido validada por inúmeros estudos.

Na primeira metade deste século, houve um número expressivo de estudos abordando qualitativamente a arquitetura vascular em tumores humanos, porém houve, relativamente, pouco interesse em relação a esses achados, até que recentes relatos demonstraram que a quantificação microvascular pode fornecer informações prognósticas em tumores sólidos humanos (Srivastava, 1988; Weidner, 1991). Embora os mecanismos de angiogênese tenham sido abordados por estudos experimentais em tumores animais (Liotta, 1974; Hori, 1990) e em cultura de células (Ingber, 1989; Rastinejad, 1989), poucos estudos haviam investigado a neovascularização diretamente em tumores humanos. A primeira evidência que a intensidade da angiogênese em um tumor humano poderia estar relacionada a metástases e sobrevida foi relatada no melanoma cutâneo. Srivastava (1986) demonstrou que lesões com espessura inferior a 0,76 mm e com relativa ausência de neovascularização não apresentavam metástases, enquanto que, posteriormente, com aumento da neovascularização, associavam-se a um acréscimo na incidência de metástases. Em melanomas com espessura entre 0,76 a 4,00 mm, a área vascular na base tumoral, em pacientes que apresentaram metástases, foi duas vezes maior do que em pacientes em que as mesmas não ocorreram (Srivastava, 1988).

O papel da angiogênese no crescimento de tumores sólidos humanos e no surgimento de metástases tem sido extensamente estudado. Uma associação estatisticamente significativa foi demonstrada entre angiogênese e incidência de metástases

em tumores sólidos, incluindo o câncer de mama (Bosari, 1992; Horak, 1992; Kaldjian, 1992; Sneige, 1992; Weidner, 1991), carcinoma pulmonar de células não-pequenas (Macchiarini, 1992) e no adenocarcinoma (Yamazaki, 1994), carcinoma de próstata (Weidner, 1993), carcinoma de bexiga (Jaeger, 1995) e em tumores da cavidade oral (Williams, 1994). Weidner (1992) demonstrou que a angiogênese tumoral é um indicador prognóstico independente em carcinoma precoce de mama. O mesmo foi demonstrado por Bremer (1996) em carcinoma precoce de cérvix uterina.

Embora a quantificação da angiogênese tenha sido realizada na maioria dos tumores sólidos humanos, há poucos estudos prospectivos analisando a relação entre o prognóstico e o desenvolvimento de microvasos (Vermeulen, 1996). O papel da angiogênese nos tumores do trato gastrointestinal tem sido recentemente explorado, contando-se com um número limitado de estudos, associando a neovascularização e prognóstico (Chung, 1996; Bossi, 1995; Engel, 1996). Maeda (1995) encontrou associação significativa entre a extensão da angiogênese e metástases em carcinoma gástrico.

Nos carcinomas colorretais, pouco é conhecido em relação à significância da neovascularização (Tanigawa, 1997).

Com base nos fatores acima descritos, estudou-se a neovascularização em tumores colorretais, a fim de validar a sua associação com as variáveis clinicopatológicas e sobrevida.

## Objetivos

### Objetivo geral

Estudar a angiogênese em secções histológicas de adenocarcinoma colorretal avançado, através de imunohistoquímica.

### Objetivos específicos

Quantificar a angiogênese nos carcinomas colorretais e estudar sua associação com:

- a) tamanho tumoral
- b) diferenciação histológica
- c) invasão tumoral
- d) metástases hematogênicas
- e) sobrevida

## MATERIAL E MÉTODO

### Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de coorte histórica.

### População estudada

Foram selecionados aleatoriamente 61 pacientes de um total de 292 pacientes submetidos à cirurgia por adenocarcinoma colorretal primário no *The First Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology - Hiroshima University School of Medicine* -, no período compreendido

entre 1988 a 1991. Este diagnóstico foi confirmado através do exame anatomopatológico.

*Critérios de inclusão:* consideraram-se válidos todos os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal avançado, operados no período entre 1988 a 1991, apresentando material histológico adequado (sem artefatos na técnica de fixação e coloração por hematoxilina-eosina que comprometessem a avaliação morfológica) e com seguimento pós-operatório.

*Critérios de exclusão:* foram excluídos deste estudo 13 pacientes. Nove deles não apresentaram seguimento, um paciente apresentou adenocarcinoma gástrico associado, dois apresentavam tumores precoces e um não apresentou material histológico adequado para a análise imunohistoquímica (material insuficiente na lâmina). Realizadas estas exclusões, a amostra ficou constituída de 48 pacientes.

## Metodologia

*Preparo das lâminas:* foram selecionados blocos de parafina contendo a porção invasiva do tumor, sendo posteriormente realizados cortes de 4 mm com fixação e montagem em lâmina de vidro e coloração com hematoxilina-eosina.

*Imunohistoquímica:* o endotélio capilar foi identificado através de imunohistoquímica. Este método representa a aplicação de princípios e técnicas imunológicas para o estudo de células e tecidos. Utilizou-se, como anticorpo primário, o anticorpo endotelial específico, *monoclonal mouse*, anti-FVIII - Fator de Von Willebrand (DAKO-vWf, F8/86; DAKO A/S, Denmark, code nº M616, lot 093) e o DAKO *StrepABComplex/HRP Duet, mouse/rabbit* (DAKO A/S, Denmark, code nº K492) e como cromógeno o DAB - diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAKO DAB *Chromogen tablets*: code nº S3000; DAKO A/S, Denmark). A análise das lâminas demonstrou imunoreatividade de cor acastanhada (DAB), contrastando com a contracoloração de fundo de cor azul (hematoxilina de Mayer), utilizando-se a temperatura ambiente (ATA) na maioria das etapas desta reação imunohistoquímica. Entre cada secção de 20 lâminas em estudo, cinco lâminas de tecido tonsilar foram utilizadas como controle positivo. Este tecido é altamente específico para o anticorpo primário, assegurando que toda a seqüência - da fixação à coloração - foi corretamente executada. O controle negativo omitiu o anticorpo primário, substituindo-o por solução salina. Isso permite avaliar a coloração inespecífica que, caso esteja presente, indica que o complexo secundário anticorpo-biotina apresenta reação cruzada com alguma substância endógena, comprometendo, portanto, a acurácia do método.

*Avaliação da microvascularização:* as lâminas foram analisadas por dois observadores (patologista e pesquisador), sem o conhecimento prévio das variáveis clínico-patológicas e do seguimento dos pacientes. Utilizou-se microscopia ótica - microscópio *Zeiss-Axiolab*, com lentes planas, acromáticas. Inicialmente, delimitou-se o campo com caneta, percorrendo-o completamente em 50, 100 e 160 aumentos. Isto tem como objetivo reconhecer, com clareza, áreas de tumor, tecido normal e a possibilidade de *background* ou outros artefatos. Os tumores foram freqüentemente heterogêneos em sua distribuição

microvascular, demonstrando áreas hipervasculares - que podem ocorrer em qualquer local - preferencialmente na margem invasiva, intercaladas com áreas de menor neovascularização. Estas áreas, encontradas em pequeno e médio aumento, foram identificadas a partir do maior número de vasos corados pelo anticorpo anti-FVIII. A quantificação subjetiva e objetiva dos microvasos nestas áreas hipervasculares foi referência, respectivamente, para a avaliação da densidade e contagem microvascular. A densidade microvascular foi subjetivamente graduada em uma escala de uma a três cruces - discreta, moderada e intensa neovascularização, respectivamente. A contagem microvascular foi objetivamente graduada em uma escala ordinal, expressa pela média do maior número de microvasos identificados entre cinco áreas hipervasculares em 160 aumentos, correspondendo a uma área de 0,785 mm<sup>2</sup>.

*Critérios histopatológicos:* neste estudo foram incluídos somente adenocarcinomas colorretais primários avançados, isto é, com invasão a partir da muscular própria. Excluíram-se tumores colorretais precoces devido ao comportamento biológico e tratamento distintos. Em todos os pacientes, dados relativos à cirurgia (localização e presença de metástases hematogênicas) e histologia (grau de diferenciação, profundidade de invasão e metástases linfonodais) foram revisados. A classificação macroscópica dos tumores seguiu a classificação de Borrmann. Todos os carcinomas foram classificados histologicamente, seguindo critérios orientados à margem invasiva (Teixeira, 1994). Assim, tumores compostos quase que inteiramente por formações glandulares regulares e arquitetura preservada foram classificados como bem diferenciados - freqüentemente há semelhança com o epitélio adenomatoso. Tumores compostos principalmente de formações glandulares, combinadas a bainhas sólidas de células malignas, foram classificados como moderadamente diferenciados. Este grupo foi posteriormente subdividido em tumores compostos de glândulas irregulares "glândulas dentro de glândulas", classificados como moderadamente bem diferenciados e tumores demonstrando dispersão de células ou ilhotas celulares, combinadas com glândulas de estrutura altamente irregular, classificados como moderadamente pouco diferenciados. Não foram encontrados neste estudo carcinomas pouco diferenciados e mucinosos. O estadiamento foi baseado na classificação de Astler-Coller.

*Seguimento dos pacientes:* considerando-se os pacientes submetidos à ressecção curativa do carcinoma colorretal primário - sem evidência de doença metastática à distância - estes foram acompanhados até 1994, com revisões trimestrais no primeiro ano e semestrais nos anos seguintes. A recorrência tumoral foi determinada através da história e exame clínico, dosagem do antígeno carcinoembrionário, radiologia, endoscopia e patologia.

## Análise estatística

Inicialmente, foram descritas as características demográficas do grupo estudado, utilizando-se medidas de tendência central e dispersão para as variáveis quantitativas, bem como percentuais para as variáveis categóricas. A descrição dos tipos de carcinomas colorretais envolveu aspectos relacionados à

sua apresentação que incluíram: localização, tipo histológico, tipo macroscópico, grau de invasão e tamanho. Para comparar a contagem microvascular entre os grupos de densidade vascular e entre os graus de diferenciação histológica foi utilizada a técnica de ANOVA, com localização de diferenças significativas pelo teste de Tukey. A avaliação da associação entre as variáveis *histopatológicas* - nível de invasão e grau de diferenciação - e os grupos de densidade vascular foi realizada através do teste do qui-quadrado. A correlação entre o tamanho do tumor (y) e a contagem microvascular (x) foi avaliada através do coeficiente de Pearson (r) e sua significância determinada através do teste t de *Student*. Para o estudo da mortalidade e da ocorrência de metástases hematogênicas e a sua relação com a contagem microvascular, procedeu-se à dicotomização desta variável. Assim, pela contagem microvascular, definiram-se dois grupos: o hipervascular, apresentando contagem igual ou acima da mediana e o hipovascular, com contagem abaixo da mediana. Para comparar as médias do tamanho tumoral entre os grupos hiper e hipovascular utilizou-se o teste t de *Student* para amostras independentes. Após, foi realizada a análise de sobrevivência, através da técnica de Kaplan-Meier e os grupos, comparados através do teste de *log-rank*. O nível de significância adotado no estudo foi de  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Epi Info v6 e *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows*.

## RESULTADOS

### Características genéricas da amostra

A amostra foi constituída de 48 pacientes, 32 (66,7%) homens e 16 (33,3%) mulheres, com idade média  $\pm$  desvio-padrão de  $65 \pm 10,4$  anos.

Em relação à localização, a maioria dos carcinomas comprometeu o reto e a junção retossigmóide, seguido pelos demais segmentos colônicos. Os procedimentos cirúrgicos mais realizados foram a retossigmoidectomia anterior (RSA) e a amputação abdominoperineal do reto (AAPR) (Tabelas 1 e 2).

### Características histopatológicas

O diâmetro tumoral, medido pelo seu maior eixo, apresentou média  $\pm$  desvio-padrão de  $47,6 \pm 20,4$  mm (mediana = 45 mm). Em 38 (79,1%) pacientes encontraram-se lesões macroscopicamente classificadas como Borrmann II, seguidas pelas lesões tipo Borrmann III em sete (14,6%) e as de tipo Borrmann I em dois (4,1%). Em um paciente (2,1%)

Tabela 1 - Localização tumoral.

Localização tumoral	Nº	%
Reto e junção retossigmóide	27	56,2
Cólon ascendente	9	18,7
Cólon sigmóide	6	12,5
Cólon transverso	4	8,3
Cólon descendente	1	2,1
Ceco	1	2,1

Tabela 2 - Procedimento cirúrgico realizado.

Procedimento cirúrgico	Nº	%
RSA e AAPR	27	56,2
Colectomia direita	11	22,9
Sigmoidectomia	6	12,5
Colectomia transversa	3	6,2
Colectomia esquerda	1	2,1

não houve descrição do aspecto macroscópico. Não foram encontradas, neste estudo, lesões macroscópicas exclusivamente infiltrativas (Borrmann IV).

Conforme a avaliação da diferenciação histológica na margem tumoral invasiva, a maior parte dos tumores foi classificada como moderadamente bem diferenciada (Tabela 3).

Em relação à profundidade de invasão, 25 (52,1%) carcinomas colorretais comprometeram a subserosa e/ou adventícia, seguidos pelo comprometimento da serosa e/ou

Tabela 3 - Diferenciação histológica na margem tumoral invasiva.

Diferenciação histológica	Nº	%
Bem diferenciado	11	22,9
Moderadamente bem	23	47,9
Moderadamente pouco	14	29,1
Pouco diferenciado	0	0,0
Mucinoso	0	0,0

gordura pericolônica/perirretal em 15 (31,2%) e invasão até a camada muscular própria em oito (16,6%). O estadiamento da neoplasia, conforme a classificação de Astler-Coller, demonstrou que a maioria dos tumores colorretais apresentou-se em estágio avançado, isto é, com metástases linfonodais e hepáticas (Tabela 4).

Tabela 4 - Estadiamento da neoplasia colorretal (classificação de Astler-Coller).

Estádio	Nº	%
A (excluídos)	0	0,0
B1	7	14,6
B2	13	27,1
C1	0	0,0
C2	14	29,1
D	14	29,1

### Avaliação da microvascularização

Inicialmente, avaliou-se a densidade microvascular em áreas hipervasculares, na margem tumoral invasiva, por quantificação subjetiva, graduando-a, conforme sua intensidade, em uma escala de uma a três cruzes. Encontraram-se 29 (60,4%) carcinomas graduados em uma cruz, 12 (25%) com duas cruzes e sete (14,5%) com três cruzes. Em seguida, foi realizada a contagem microvascular nestas mesmas áreas, através da quantificação objetiva, encontrando-se uma contagem média  $\pm$  desvio-padrão de  $15,1 \pm 6,87$  microvasos/corte (mediana = 14; mín - máx = 5,8

- 32,4). Posteriormente, dividiu-se a amostra em dois grupos distintos, pela mediana: (a) grupo hipervascular que apresentou contagem microvascular igual ou acima da mediana ( $\geq 14$  microvasos/corte), e (b) grupo hipovascular com contagem microvascular abaixo da mediana ( $< 14$  microvasos/corte).

Estudando a relação entre os métodos de avaliação microvascular, observou-se que a contagem microvascular média foi mais elevada quanto maior o número de cruzes (Tabela 5).

**Tabela 5 - Contagem microvascular média na escala de cruzes de densidade microvascular.**

Densidade microvascular	Contagem microvascular		Nº
	média	± desvio-padrão	
+ baixa densidade	10,8 <sup>a</sup>	± 4,0	29
++ } elevada	20,7 <sup>b</sup>	± 4,8	12
+++ } densidade	23,2 <sup>b</sup>	± 4,5	7

ANOVA,  $p < 0,001$ . Os índices (a) e (b) representam as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

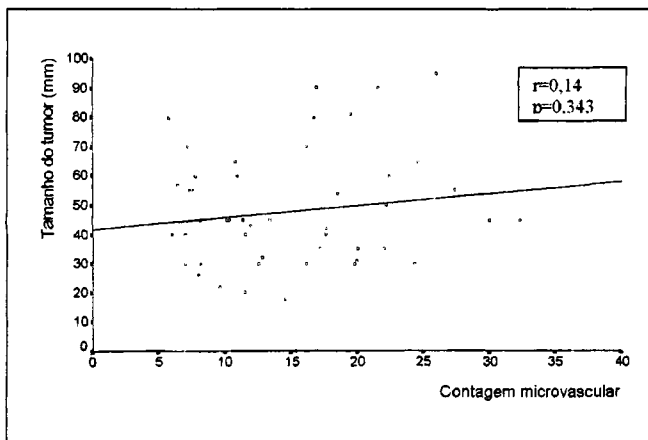
### Tamanho tumoral

Comparando-se o tamanho tumoral nos grupos hiper e hipovascular, obteve-se uma diferença de 5,25 microvasos/corte, que não apresentou significância estatística (Tabela 6, Fig. 1).

**Tabela 6 - Tamanho tumoral em relação à contagem microvascular.**

	Tamanho (em mm)		Nº
	Média	± desvio-padrão	
Grupo hipervascular ( $\geq 14$ microvasos)	50,25	± 24,51	24
Grupo hipovascular ( $< 14$ microvasos)	45,00	± 15,44	24

( $p = 0,380$ ).



**Fig. 1 - Gráfico de dispersão de pontos com reta ajustada entre o tamanho tumoral e a contagem microvascular. A análise desta figura demonstra que não houve associação significativa entre a contagem microvascular e o tamanho tumoral.**

### Diferenciação histológica e densidade microvascular

A partir da subdivisão da amostra, conforme a densidade microvascular em grupos de baixa (uma cruz,  $n = 29$ ) e elevada densidade (duas e três cruzes,  $n = 19$ ), e comparando-os com a diferenciação histológica, observou-se que, aparentemente, a proporção de densidade microvascular elevada aumenta quanto menor a diferenciação histológica, porém não foi detectada significância estatística (qui-quadrado para associação linear,  $p = 0,253$ ). A elevada densidade microvascular nos grupos bem, moderadamente bem e moderadamente pouco diferenciados foi de 27,3; 39,1 e 50%, respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7 - Diferenciação histológica e densidade microvascular.**

Diferenciação histológica	Densidade microvascular		Total
	elevada	baixa	
Bem diferenciado	3 27,3%	8 72,7%	11
Moderadamente bem	9 39,1%	14 60,9%	23
Moderadamente pouco	7 50,0%	7 50,0%	14
Total	19	29	48

### Diferenciação histológica e contagem microvascular

Inicialmente, determinou-se a contagem microvascular média  $\pm$  desvio-padrão nos grupos bem, moderadamente bem e moderadamente pouco diferenciados, encontrando-se, respectivamente,  $13,2 \pm 7,8$ ;  $15,6 \pm 6,8$ ;  $15,6 \pm 6,5$  microvasos/corte. Não foram detectadas diferenças significativas entre esses grupos (ANOVA,  $p = 0,602$ ).

Analisando a amostra estudada pela contagem microvascular mediana e subdividindo-a em grupo hipervascular e grupo hipovascular, observou-se que a proporção de hipervascularidade aumenta, quanto menor a diferenciação histológica. Embora se tenha encontrado uma diferença de 20,7% na probabilidade de hipervascularidade entre os grupos bem e moderadamente pouco diferenciado, esta diferença não alcançou significância estatística (qui-quadrado para tendência linear,  $p = 0,321$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8 - Diferenciação histológica e contagem microvascular.**

Diferenciação histológica	Contagem microvascular		Total
	hipervascular	hipovascular	
Bem diferenciado	4 36,4%	7 63,6%	11
Moderadamente bem	12 52,2%	11 47,8%	23
Moderadamente pouco	8 57,1%	6 42,9%	14
Total	24	24	48

## Invasão tumoral

Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a contagem microvascular e a profundidade de invasão tumoral; isto demonstra que à medida que aumenta a profundidade de invasão tumoral, aumenta, também, a proporção da contagem microvascular elevada de forma aproximadamente linear (qui-quadrado para associação linear,  $p = 0,02$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 - Invasão tumoral e contagem microvascular.

Invasão tumoral	Grupo hipervascular	Grupo hipovascular	Total
Muscular própria	2 25%	6 75%	8
Subserosa	11 44%	14 56%	25
Serosa e gordura pericôlonica/perirretal	11 73,3%	4 26,7%	15
Total	24	24	48

## Metástases hematogênicas

No estudo realizado, foram encontradas metástases hematogênicas em 20 (41,7%) pacientes, sendo 13 (65%) sincrônicas e sete (35%) metacrônicas. As metástases hepáticas corresponderam a 70% do total, seguidas pelas metástases pulmonares em 25% dos casos e, por último, pelas metástases múltiplas (fígado, pulmão e osso) com 5%. Encontrou-se uma pequena diferença, sem significância estatística ( $p = 0,238$ ), na contagem microvascular média no grupo com metástases hematogênicas (média  $\pm$  desvio-padrão de  $16,5 \pm 7,9$ ) em relação ao grupo que não as apresentava (média  $\pm$  desvio-padrão de  $14,1 \pm 6$ ).

## Sobrevida

Considerando-se os pacientes submetidos à ressecção curativa do carcinoma colorretal primário, estes foram acompanhados para avaliar a relação entre a contagem microvascular e sobrevida. O seguimento encontrado nos pacientes descrito pela mediana (mínimo-máximo) foi de 1197 dias (34-1953). A sobrevida nos grupos hiper e hipovascular foi comparada pelo método de Kaplan-Meier encontrando-se, ao final do seguimento, uma proporção de sobrevida de 63,6% e 86,4%, respectivamente. Observou-se uma diferença percentual de 22,8% que não atingiu a significância estatística previamente estabelecida ( $p = 0,12$ ).

Não há evidência de uma distribuição heterogênea de casos com estadiamento tumoral avançado entre os grupos hiper e hipovasculares - aparentemente, a distribuição do estadiamento avançado nos grupos é semelhante: 62,5 e 54,2%, respectivamente (Tabela 10).

## DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A literatura nacional é escassa, encontrando-se revisões de literatura em angiogênese tumoral de Menke (1993) e Ribeiro

Tabela 10 - Distribuição do estadiamento tumoral entre os grupos hiper e hipovascular.

Estadiamento	Grupo hipervascular	Grupo hipovascular	Total
B1 e B2	15 62,5%	13 54,2%	28
C2 e D	9 37,5%	11 45,8%	20
Total	24	24	48

( $P = 0,558$ )

(1994). Menke (1993) aborda as possibilidades terapêuticas no câncer de mama no ano 2001, citando, entre estas, a utilização de drogas que inibem os fatores de crescimento e a angiogênese tumoral. Embora existam variações significativas entre as populações e na metodologia de avaliação utilizada, a maioria das publicações internacionais tem demonstrado o valor prognóstico da angiogênese em tumores sólidos humanos (Saclarides, 1997; Folkman, 1995; Tanigawa, 1997; Chung, 1996). Porém, para a quantificação da angiogênese ser um fator prognóstico confiável, a metodologia aplicada em sua avaliação deve apresentar baixa variabilidade intra e interobservador, a fim de permitir a comparação de resultados provenientes de diferentes instituições. Em recente publicação, estabeleceu-se um Consenso Internacional na metodologia e critérios de avaliação da angiogênese em tumores sólidos humanos (Vermeulen, 1996). São relatados os métodos convencionais de identificação e quantificação dos microvasos, bem como a proposta de padronizá-los.

Vermeulen (1996) aborda o método imunohistoquímico para a identificação dos microvasos - capilares e pequenas vênulas - a partir de cortes histológicos tumorais corados com hematoxilina-eosina. Nos carcinomas colorretais, a identificação imunohistoquímica da microcirculação tem utilizado, como anticorpo primário, principalmente o anticorpo anti-FVIII (Takebayashi, 1996; Saclarides, 1994; Frank, 1995; Shanthalaxmi, 1996; Roncucci, 1992) seguido pelo anti-CD31 (Bossi, 1995), anti-CD34 (Tanigawa, 1997) e o BW200 (Porschen, 1989). Há também estudos combinando os anticorpos anti-FVIII e anti-CD34 (Tomisaki, 1996; Hillen, 1997) e o anti-FVIII e anti-CD31 (Vermeulen, 1995). O anticorpo anti-FVIII parece ser um marcador mais específico para células endoteliais, comparado ao anti-CD34 - este cora alguns leucócitos e células inflamatórias, além de bainhas neurais periféricas -, porém é ausente em parte do endotélio capilar, no tecido tumoral (Tomisaki, 1996; Vermeulen, 1996). O anticorpo anti-CD31 é um marcador mais sensível para células endoteliais do que o anti-FVIII (Kuzu, 1992); apresenta reação cruzada com certas células inflamatórias, tais como células plasmáticas ou células estromais, sem interferir na identificação microvascular - esta reação cruzada pode ser facilmente discriminada da reatividade celular endotelial, com base no padrão de coloração e na morfologia celular. Há variações consideráveis na quantificação microvascular em relação ao anticorpo primário utilizado, porém os estudos demonstram correlação entre as contagens quando foi utilizado mais de um anticorpo primário.

A seleção de uma área representativa, na secção histológica, para a quantificação microvascular é de fundamental importância, devido à intensa heterogenicidade vascular. Citam-se os trabalhos de Weidner (1991), que demonstrou esta importante heterogenicidade na microvascularização tumoral em 49 secções histológicas de carcinoma invasivo de mama. Foram identificadas áreas com intensa neovascularização principalmente na margem tumoral invasiva, expressando-se a contagem microvascular como o maior número de microvasos identificados em 200 e 400 aumentos nestas áreas. Demonstrou-se uma contagem microvascular mais elevada nas pacientes com carcinoma primário de mama, apresentando metástases linfonodais à distância, em relação às pacientes com doença localizada. Em 1992, Weidner estudou 165 pacientes com carcinoma de mama em estágio precoce e utilizou a mesma metodologia para a contagem microvascular. Encontrou associação entre a contagem microvascular elevada e metástases à distância e diminuição do período de recorrência. A partir destes relatos, seguiu-se a quantificação microvascular em áreas de mais intensa neovascularização - localizadas predominantemente na margem tumoral invasiva e originalmente denominadas *hotspots* (Pritchard, 1995; Vermeulen, 1995, 1996). Além do valor prognóstico já demonstrado com esta metodologia em carcinoma invasivo de mama (Weidner, 1991, 1992; Horak, 1992; Toi, 1993), outros fatores também estão associados à quantificação microvascular nestas áreas previamente selecionadas: (a) devido à heterogenicidade intratumoral, obter uma avaliação reproduzível da densidade microvascular implicaria a avaliação de grandes áreas tumorais; (b) a relação entre as células tumorais e as células endoteliais é particularmente importante nestas áreas altamente vascularizadas - se as áreas hipervasculares se originam a partir de clones de células tumorais angiogênicas, estas predominantemente invadem a circulação e ocasionam as metástases, e (c) o início da atividade angiogênica em um determinado tumor é geralmente restrito a áreas limitadas. O número de áreas hipervasculares varia de acordo com o tamanho da secção histológica. Vermeulen (1995) identificou duas a sete áreas hipervasculares em cada secção tumoral de 34 carcinomas colorretais estudados. A heterogenicidade microvascular facilitou a detecção de áreas com intensa neovascularização localizadas, principalmente, na margem invasiva. Estas áreas, identificadas pelo maior número de microvasos corados, apresentavam-se separadas por alguns milímetros com baixa densidade vascular. Ocasionalmente, os tumores demonstraram baixa densidade vascular em toda sua secção tecidual, porém não foram encontrados tumores com densidade microvascular uniformemente elevada.

No presente estudo, a estrutura microvascular do carcinoma colorretal caracterizou-se por áreas de elevada densidade vascular - localizadas principalmente na margem tumoral invasiva - separadas por outras com baixa densidade. A contagem microvascular em cada secção tumoral - método quantitativo e avaliado objetivamente - foi orientada à margem invasiva e o seu resultado expresso em microvasos/corte, a partir da média entre cinco áreas hipervasculares (conside-

rando-se em cada uma destas o número de microvasos contáveis). Os dados obtidos (contagem microvascular média = 15,1; mediana = 14; mínima-máxima = 5,8 - 32,4) assemelham-se aos descritos por Saclarides (1994). Este autor, em um estudo de 48 pacientes com carcinoma retal, utilizou, como anticorpo primário, o anticorpo anti-FVIII determinando uma contagem microvascular média de 17,4 microvasos/corte.

A ausência de associação estatisticamente significativa entre o tamanho tumoral e a contagem microvascular, que se constatou na amostra, compara-se aos relatos de Tanigawa (1997), Shantalaxmi (1996), Saclarides (1994), Frank (1995), Tomisaki (1996) e Roncucci (1992). Embora a angiogênese seja uma etapa essencial na progressão inicial do tumor, os dados demonstram que o efeito determinante da angiogênese no crescimento final do tumor é pequeno. Provavelmente, outros fatores estejam envolvidos, dentre eles a interação das células tumorais com os tecidos do hospedeiro, através de vias autócrinas, parácrinas e endócrinas, isoladamente ou em combinação, estimulando ou inibindo a proliferação celular tumoral. Roncucci (1992) avaliou a cinética celular de carcinomas colorretais após a administração *in vivo* de Bromodesoxiuridina (um análogo não radioativo da Timidina que é incorporado ao DNA durante a fase-S do ciclo celular - considerado uma boa estimativa da velocidade de proliferação celular). Neste estudo, demonstrou-se que a proliferação celular tende a decrescer com o aumento do tumor e com o avanço do estágio tumoral.

O carcinoma colorretal é composto de múltiplas populações celulares com diferentes propriedades malignas e biológicas. Clones de células mais malignas tendem a aparecer gradualmente à medida que ocorre a progressão tumoral - da mucosa à submucosa e da muscular própria à serosa - com diferentes implicações diagnósticas (Newland, 1981). O fato de a angiogênese tumoral ser mais pronunciada em estádios avançados sugere que o aumento da vascularização reflete o aumento do potencial maligno (Tomisaki, 1996; Engel, 1996). Como resultado, a maioria dos carcinomas colorretais são heterogêneos e compostos de grupos celulares com variados graus de diferenciação histológica. A classificação histológica foi orientada à margem invasiva, pois esta parte profunda do tumor representa a área com o maior potencial maligno - é a que invade, dissemina-se localmente e metastatiza. Em um estudo abordando a significância da subclassificação histológica em 142 carcinomas colorretais, Teixeira (1994) demonstrou que os tumores moderadamente pouco diferenciados apresentaram maior potencial maligno, a partir da maior incidência de invasão linfática, venosa, linfonodal e metástases hepáticas. Os dados, incluídos no presente trabalho, demonstram diferença - sem atingir significância estatística - de densidade e contagem microvascular mais elevada nos tumores moderadamente pouco diferenciados. A angiogênese pode sustentar a maior atividade proliferativa observada neste subgrupo histológico, conforme demonstrado previamente por Teixeira (1994) a partir da expressão significativamente mais elevada do antígeno de proliferação celular nuclear - PCNA. Porém, outros fatores provavelmente estão relacionados ao maior potencial de invasão tecidual e metástases neste grupo,

incluindo-se fatores de adesão celular tumoral ao endotélio vascular (diversas moléculas regulam esta adesão celular como o receptor CD44, integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  e  $\beta 4$ ) e a degradação da matriz extracelular e membrana basal a partir de enzimas produzidas pelas células tumorais (metaloproteínas, incluindo enzimas que degradam o colágeno intersticial - colágeno tipo IV, colágeno tipo V e *proteoglicans*).

Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa na quantificação angiogênica entre os tumores com invasão transmural e da gordura pericolônica/perirretal em relação aos tumores restritos à parede. Este achado compara-se aos relatos de Saclarides (1994), Takebayashi (1996) e Tanigawa (1997) e indica que a atividade proliferativa tumoral, resultando em invasão transmural progressiva, é sustentada pela angiogênese. Liotta (1991) demonstrou que ambas as etapas - angiogênese e invasão tumoral - são funcionalmente relacionadas. A característica comum de muitos fatores de crescimento que induzem à angiogênese, tais como o bFGF, é o estímulo das células endoteliais em três funções específicas: proteólise, motilidade e proliferação. Esta mesma tríade de propriedades também caracteriza a invasão celular tumoral. A distinção entre estas duas populações celulares é que as células tumorais não são auto-reguladas nestas três propriedades, enquanto que as células endoteliais podem reverter a um estado não-angiogênico, quando o estímulo à proliferação vascular for interrompido.

A invasão dos tecidos adjacentes ao tumor primário e a penetração nos vasos sanguíneos representam os pontos centrais do processo metastático. No estudo realizado, incluíram-se os carcinomas de cólon e reto, uma vez que o adenocarcinoma que se desenvolve nestes órgãos não pode ser distinguido anatomopatologicamente e ambos metastatizam de maneira similar, excetuando-se os carcinomas retais que apresentam um índice de recorrência local mais elevado. Encontramos contagem microvascular mais elevada, sem significância estatística, nos pacientes com metástases hematogênicas - sincrônicas e metacrônicas. A literatura revisada aponta para uma contagem microvascular mais elevada nos pacientes com carcinoma colorretal primário e metástases hematogênicas (Saclarides, 1994; Tomisaki, 1996; Tanigawa, 1997; Takebayashi, 1996; Shantalaxmi, 1996; Hillen, 1997; Engel 1996).

Porém, a quantificação angiogênica, isoladamente, não identifica todos os pacientes com doença metastática oculta ou aqueles com probabilidade de metástases à distância. As razões apontadas são as seguintes (Fidler, 1997; Liotta, 1991):

(a) no momento do diagnóstico, os tumores humanos são heterogêneos e consistem de subpopulações celulares com diferentes propriedades biológicas, incluindo capacidade de invasão e metástases;

(b) o processo metastático é seqüencial e consiste de uma série de etapas interligadas; para resultar em metástases clinicamente detectáveis, as células tumorais devem completar todas as etapas deste processo e sobrepor-se ao sistema imune do hospedeiro - se houver falha em completar uma ou mais etapas deste processo, as células serão eliminadas. Por exemplo, células tumorais que induzem à angiogênese intensa, mas que

não sobrevivem na circulação ou não proliferam em órgãos distantes, não resultarão em metástase, o mesmo ocorrendo com células que não apresentam motilidade e capacidade de invasão. Uma pequena percentagem de células tumorais circulantes (< 0,01%) inicia com sucesso a colonização metastática. Assim, as metástases representam um processo de competição altamente seletivo, favorecendo a sobrevivência de uma subpopulação de células tumorais metastáticas que preexistem dentro da heterogenicidade do tumor primário;

(c) embora nem todos os grandes tumores angiogênicos possam produzir metástases, a inibição da angiogênese reduz o crescimento do tumor primário e dos sítios secundários, e assim previne o crescimento de metástases clinicamente detectáveis.

Conclui-se, portanto, que a angiogênese é uma etapa essencial no início e final do processo metastático, mas, isoladamente, não resulta em efetivo desenvolvimento de metástases.

Os dados demonstram, ao final do seguimento, uma proporção de sobrevivência maior no grupo hipovascular (86,4%) em relação ao hipervascular (63,6%). Apesar da diferença percentual (22,8%), não se encontrou significância estatística ( $p = 0,12$ ).

Aparentemente, há um efeito da microvascularização como um fator prognóstico de mortalidade, oscilando na faixa de 20% entre os dois grupos. No entanto, a ausência de significância pode ser um reflexo do tamanho da amostra.

Com os dados disponíveis, é possível afirmar que a quantificação angiogênica, entre outros fatores prognósticos comumente utilizados na avaliação dos pacientes com carcinoma colorretal, pode ser um importante indicador do comportamento biológico tumoral, a partir da identificação de um subgrupo de tumores com maior potencial maligno, manifestado nesta amostra por um nível de invasão tecidual significativamente mais elevado. A identificação desses subgrupos tumorais com comportamento biológico mais agressivo, acompanhados de uma intensa resposta angiogênica, é importante para predizer quais pacientes poderiam ser potenciais candidatos à cirurgia curativa e aqueles que deveriam submeter-se à terapêutica adjuvante e ao seguimento pós-operatório mais freqüente.

## Perspectivas

A angiogênese é um processo complexo, envolvendo a dissolução da membrana basal por proteases, migração celular endotelial e proliferação, resultando em formação de novas redes capilares. Cada uma destas etapas é um possível alvo para intervenção farmacológica.

Em 1971, Folkman pioneiramente postulou a idéia de que a terapêutica antiangiogênica poderia representar uma nova abordagem no tratamento de tumores sólidos; porém a identificação das primeiras moléculas antiangiogênicas ocorreu aproximadamente 10 anos após. Os primeiros inibidores angiogênicos a serem estudados foram a Protamina e o Fator Plaquetário 4 (PF4), seguidos pelos esteróides angiostáticos, Fumagilina e seus análogos sintéticos e,



posteriormente, pelo interferon  $\alpha$ -2a (Taylor, 1982). White (1989) realizou a primeira intervenção antiangiogênica com sucesso, utilizando o interferon  $\alpha$ -2a em uma criança de sete anos portadora de hemangiomas capilar pulmonar - uma doença rara, caracterizada pela intensa proliferação capilar pulmonar e com elevada mortalidade. Isto precipitou uma ativa pesquisa de agentes angiossuppressores e, atualmente, encontram-se aproximadamente 10 inibidores angiogênicos em ensaios clínicos (fase I e II) em uma ampla variedade de tumores, incluindo mama, cólon, pulmão, próstata, e sarcoma de Kaposi. Os dois inibidores angiogênicos em que há maior experiência são o Interferon  $\alpha$ 2a e o TNP-470 (AGM-1470). Este último é um análogo sintético da Fumagilina e foi aprovado pelo FDA para fase I de teste em pacientes com tumores sólidos (Folkman, 1997).

O objetivo geral da terapêutica antiangiogênica é reduzir uma área focal de crescimento capilar intenso e progressivo ao seu estado quiescente, pois, em termos terapêuticos, o período mais vulnerável de um tumor sólido é o intervalo que antecede a vascularização (Folkman, 1971, 1995). Paradoxalmente, a neovascularização reduz a acessibilidade do tumor à quimioterapia. Tumores em estágio inicial da neovascularização são usualmente bem perfundidos, porém quando detectados clinicamente, o aumento da pressão intersticial, ocasionado pela alteração de permeabilidade de vasos malformados e pela ausência relativa de linfáticos intratumorais, ocasiona compressão vascular e necrose central. Estudos em roedores demonstram que a terapêutica antiangiogênica aumenta a liberação de quimioterápicos ao tumor, provavelmente por descompressão tumoral e redução da pressão intersticial; a radioterapia também é potencializada pela terapêutica antiangiogênica através da diminuição da hipóxia tumoral (Teicher, 1994). Os agentes antiangiogênicos suprimem a neovascularização por inibir a proliferação e migração das células endoteliais, ao invés de destruir células tumorais. A regressão do leito vascular é um processo mais lento do que a lise celular tumoral, portanto a terapêutica antiangiogênica necessita meses a anos, sem interrupção. A baixa toxicidade observada e a ausência de resistência significativa em estudos animais sugerem que a terapêutica antiangiogênica, administrada por um período de tempo maior, possa ser bem tolerada. Ainda, a combinação de terapêutica antiangiogênica e agentes citotóxicos pode ser mais efetiva do que a administração de um agente, isoladamente (Van Cutsem, 1996).

O futuro do tratamento do câncer colorretal é promissor. Muitas pesquisas estão sendo realizadas, incluindo a procura de novos fatores prognósticos e a utilização de novas drogas no tratamento adjuvante. Isto provavelmente resultará em melhora das condições gerais e aumento da sobrevida dos pacientes.

## CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos nesta coorte permite concluir que:

1) A angiogênese apresenta associação estatisticamente significativa com a invasão tumoral no adenocarcinoma colorretal.

2) A angiogênese representa uma etapa intermediária na geração de metástases hematogênicas, porém, isoladamente, não determina o surgimento das mesmas.

3) A padronização da técnica de imunohistoquímica e a metodologia de quantificação microvascular são fundamentais para a comparação de resultados e utilização da angiogênese como um indicador prognóstico fidedigno.

---

TARTA C, PROLLA JC, GUS P, NETO CC, SILVA VD & TEIXEIRA CR -

**SUMMARY: The colorectal carcinoma is one of the most prevalent solid tumors in the world. It is the third most frequent tumor in both sexes, being preceded by lung and stomach carcinoma among men and breast and cervix carcinoma among women. In Brazil, the colorectal carcinoma is among the five more usual neoplasias, ranked fifth in mortality. In 1997, an incidence of 8980 new cases among men and 8650 new cases among women was estimated. The colorectal carcinoma has a global survival rate of 40%, and a small increase has been shown in the last 40 years. The prognostic indicators in this type of cancer are the histological differentiation, the depth of invasion and the lymphatic invasion. Molecular and immunohistochemical approaches have been recently made in order to find a new prognostic indicator other than the ones mentioned above. The quantitative analysis of tumor angiogenesis, defined as the growth of new capillars toward the tumor, has been shown to have clinical application in the survival and recurrence analysis. 48 patients undergoing surgery of colorectal carcinoma at The First Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology - Hiroshima University School of Medicine - from 1988 to 1991 were retrospectively studied. There was a significant statistical correlation between angiogenesis and the depth of tumor invasion, and it was demonstrated that the tumor spreading activity is supported by angiogenesis. A non-significant statistical association was found between the angiogenesis quantification, hematogenic metastasis, survival and clinical-pathological variables such as size and histological differentiation. The standardization of the immunohistochemistry and the methodology of microvascular quantification are fundamental for comparing results and using angiogenesis as a reliable prognostic indicator.**

---

## REFERÊNCIAS

- Algire GH. A adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4: 1-11.
- Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945; 6: 73-85.
- American Cancer Society. *Cancer facts and figures - 1995*. Atlanta: American Cancer Society, 1995.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: Referências Bibliográficas. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.9 p.
- Bosari S, et al. Microvessel quantification and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-761.
- Bossi P, et al. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantification in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55: 5049-5053.
- Bonaparte YP, et al. Inmunorregulación del crecimiento tumoral en un sistema murino. *Medicina (B. Aires)* 1989; 49: 265-270.
- Boyle P, Zaridze DG, Smans M. Descriptive epidemiology of colorectal

- cancer. *Int J Cancer* 1985; 36: 9-18.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer. O Problema do Câncer no Brasil. 4 ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA/Pro-Onco, 1997.
- Brem H, Folkman J. Analysis of experimental antiangiogenic therapy. *J Ped Surg* 1993; 28: 445-451.
- Brem S, et al. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* 1976; 36: 2807-2812.
- Bremer GL, et al. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 126-131.
- Chalkley HW. Growth and vascularization of transplantable mouse melanomas. Special Publications of the NY Acad Sci, 1948; 4: 164. (Comments on Algiri GH and Legallais FY.)
- Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastro-intestinal tumors. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2501-2505.
- Coleman M, et al. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon: IARC, 1993.
- Coman DR, Sheldon WF. The significance of hyperemia around tumors implants. *Am J Pathol* 1946; 22: 821.
- De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Lab Invest* 1995; 73: 992-996.
- Dickinson AJ, et al. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994; 74: 762-766.
- Dukes CE, Bussey HJR. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 1958; 12: 309-320.
- Eij NAM, Davel L, Lustig ES. Modulación de la angiogénesis inducida por linfocitos por proteínas de la matriz extracelular. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1993; 43: 53-57.
- Ekberg H, et al. Pattern of recurrence in liver resection for colorectal secondaries. *World J Surg* 1987; 11: 541-547.
- Engel CJ, et al. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes Staging. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1260-1265.
- Fidler IJ. Molecular Biology of Cancer: invasion and metastasis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS (ed.) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997, p.135-152.
- Fletcher CDM. Diagnostic Histopathology of Tumors. Churchill New York: Livingstone, 1995; 1: 260.
- Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. In: DeVita VT, Rosenberg AS (ed.) *Important Advances in Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1985: 42-62.
- \_\_\_\_\_. Antiangiogenic Therapy. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (ed.) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997, p. 3075-3085.
- \_\_\_\_\_. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763.
- \_\_\_\_\_. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, et al. (ed.) *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: WB Saunders, 1995, p. 206-232.
- \_\_\_\_\_. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974; 34: 2109-2113.
- \_\_\_\_\_. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
- \_\_\_\_\_. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
- Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* 1966; 164: 491-502.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.
- Folkman J, et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 39: 58-61.
- Frank RE, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222: 695-699.
- Gimbrone MA, et al. Preservation of vascular integrity in organs perfused *in vitro* with a platelet-rich medium. *Nature* 1969; 222: 33-36.
- Gimbrone MA, et al. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 413-427.
- Gimbrone MA, et al. Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972; 136: 261-276.
- Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 111-23.
- Greene HSN. Heterologous transplantation of mammalian tumors. *J Exp Med* 1961; 73: 461-474.
- Guidi AJ, et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma *in situ* of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 614-619.
- Hamiltort JM. Adjuvant therapy for gastrointestinal cancer. *Curr Opin Oncol* 1994; 6: 435-440.
- Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453-1457.
- Hidalgo CO, Reynoso G. Angiogenesis tumoral. *Patología* 1994; 32: 43-48.
- Hillen HF, et al. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997; 74: 81-85.
- Horak E, et al. Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
- Hori K, et al. *In vivo* analysis of tumor vascularization in the rat. *JPN Cancer Res* 1990; 81: 279-288.
- Ide AG, Baker N, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 1939; 42: 891-899.
- Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis *in vitro*: role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; 109: 317-330.
- Jaeger TM, et al. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastasis in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995; 154: 69-71.
- Kaldjian E, Jin L, Lloyd R. Immunohistochemical analysis of breast carcinomas: correlation of estrogen and progesterone receptors, proliferative activity, tumor vascularity and lymph node metastasis. *Mod Pathol* 1992; 5: 14a.
- Kewenter J, et al. Screening and rescreening for colorectal cancer: a controlled trial of fecal occult blood testing in 27,700 subjects. *Cancer* 1988; 62: 645-651.
- Knighton D, et al. Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 1977; 35: 347-356.
- Kuzu I, et al. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol* 1992; 45: 143-148.
- Lien W, Ackerman NB. The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with use of perfused silicone rubber. *Surg* 1970; 68: 334-340.
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastasis following tumor implantation. *Cancer Res* 1974; 34: 997-1004.
- \_\_\_\_\_. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976; 36: 889.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.
- MacChiarini P, et al. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
- Maeda K, et al. Tumour angiogenesis and tumor cell proliferation as a prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995; 72: 319-323.
- Mahadevan V, Hart IR. Metastasis and angiogenesis. *Acta Oncologica* 1990; 97-103.
- Martin L, et al. Vascular heterogeneity in breast cancer assessed by microangiography and immunohistochemistry. *Br J Surg* 1996; 83: 702.
- Menke CH, et al. Câncer da mama: depois de 2001. *Rev FAMED/HCPA* 1993; 13: 154-158.
- Miguez M, Davel L, Sacerdote de Lustig E. Actividad angiogénica y tumor. *Medicina* 1981; 41: 369-372.
- Minsky B, et al. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and

- rectum. II. The influence of blood vessels invasion. *Cancer* 1988; 61: 1417-1424.
- Morson BC, Dawson IMP. *Gastrointestinal Pathology*. Oxford: Blackwell Scientific, 1972.
- Newland RC, et al. The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma. *Cancer* 1981; 47: 1424-1429.
- Olivarez D, et al. Neovascularization in clinical stage. A testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res* 1994; 54: 2800-2802.
- Parker SL, et al. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 65: 55-XX.
- Philips RKS, Hittinger R, Blesovsky L. Large bowel cancer: surgical pathology and its relationship to survival. *Br J Cancer* 1984; 71: 604-610.
- Pili R, et al. Altered angiogenesis underlying age-dependent changes in tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1303-1314.
- Porschen R, et al. Critical evaluation of histochemical and immunochemical methods for the demonstration of vascular supply in rectal and oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1989; 60: 299-302.
- Prehn RT. The inhibition of tumor growth by tumor mass. *Cancer Res* 1991; 51: 2-4.
- Pritchard AJ, et al. Evidence for a weak angiogenic response to human colorectal cancers. *Br J Cancer* 1995; 71: 1081-1086.
- Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-355.
- Ribatti D, et al. Angiogenesis induced by B-cell non-Hodgkin lymphomas. Lack of correlation with tumor malignancy and immunological phenotype. *Anticancer Res* 1990; 10: 401-406.
- Ribeiro JA, Assumpção C. Angiogênese tumoral. *Rev Bras Cancerol* 1994; 40: 175-177.
- Rice G, Bevilacqua M. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 1988; 246: 1303-1306.
- Roncucci L, et al. Cell kinetics evaluation of colorectal tumors after *in vivo* administration of Bromodeoxyuridine. *Int J Cancer* 1992; 52: 856-861.
- Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 253-260.
- Saclarides TJ, et al. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-926.
- Scharovsky OG. Acerca de la complejidad del proceso metastásico. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1994; 28: 231-237.
- Shanthalaxmi M, et al. Tumor angiogenesis in primary and metastatic colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 1073-1080.
- Shing Y, et al. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984; 223: 1296-1299.
- Shubik P. Vascularization of tumors: a review. *J Cancer Res Clin Oncol* 1982; 103: 211-26.
- Skinner AS, Frydman GM, O'Brien PE. Microvascular structure of benign and malignant tumors of the colon in humans. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 373-384.
- Skinner AS, Tutton PJ, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* 1990; 50: 2411-2417.
- Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 800-804.
- Sneige N, et al. A Multiparameter analysis of potential prognostic factors in node negative breast cancer patients. *Mod Pathol* 1992; 5: 18a.
- Srivastava A, et al. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphologic and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-1209.
- Srivastava A, et al. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0,76-4,00 mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 1988; 133: 419-423.
- Takebayashi Y, et al. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 226-231.
- Tanigawa N, et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 2671-2676.
- Tanigawa N, et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1043-1046.
- Aylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982; 297: 307-312.
- Teicher BA, et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994; 57: 920-925.
- Teixeira CR. The clinical significance of the histologic subclassification of colorectal carcinoma. Hiroshima University School of Medicine, 1994. 107 p. (Tese de Doutorado).
- Teixeira CR, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 575-579.
- Thompson WD, et al. Tumor acquire their vascularity by vessel incorporation, not vessel in growth. *J Pathol* 1987; 151: 323-332.
- Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 371-374.
- Tomisaki SI, et al. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77: 1722-1728 (Suppl.)
- Urbach F. Anatomy and pathophysiology of skin tumor capillaries. *Nat Cancer Inst Monogr* 1963; 10: 539-559.
- Van Cutsem E. A Glimpse of the future. New directions in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 23-27.
- Van Hoef ME, et al. Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1141-1445.
- Vermeulen PB, et al. Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Br J Cancer* 1995; 71: 340-343.
- Vermeulen PB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-2484.
- Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest* 1966; 15: 464-478.
- Weidner N, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887.
- Weidner N, et al. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
- Weidner N, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
- Weinstat-Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *Faseb J* 1994; 8: 401-407.
- White CW, et al. Treatment of pulmonary hemangiomas with recombinant interferon alfa-2a. *N Engl J Med* 1989; 320: 1197-1200.
- Williams JK, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 1994; 168: 373-380.
- Williams RG. The vascularity of normal and neoplastic grafts *in vivo*. *Cancer Res* 1951; 11: 139-149.
- Wilmink ABM. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 483-493.
- Wolmark N, Fisher B, Wieand HS. The prognostic value of the modifications of the Dukes' C class of colorectal cancer: an analysis of the NSABP trials. *Ann Surg* 1986; 302: 115-22.
- Yamazaki K, et al. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994; 74: 2245-2250.
- Ziche M, Gullino PM. Angiogenesis and preneoplastic progression *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 483-487.