

LEANDRO MUTSCHALL

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VEGF E O
ESTADIAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL**

JOINVILLE

2009

LEANDRO MUTSCHALL

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VEGF E O
ESTADIAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville.
Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho.
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE

2009

Dedico este trabalho à minha esposa Diana, com amor, admiração e gratidão, por sua compreensão, estímulos, carinho e presença que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia. Meus agradecimentos por ter aceito se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho e Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França;

A Leslie E. Ferreira pela sua paciência e atenção;

Ao Serviços Integrados de Patologia, especialmente ao Dr. Hercílio Fronza Júnior e a Rodrigo Blasius;

Aos meus professores e colegas do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente - Turma VI, com os quais tive momentos agradáveis e inesquecíveis.

"Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso."

Albert Einstein

RESUMO

Os estudos em biologia molecular desenvolvidos nas últimas décadas, possibilitaram grandes avanços para uma maior compreensão da carcinogênese colorretal. Na década de 80 pesquisadores descobriram uma proteína com a capacidade de aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Inicialmente esta proteína foi denominada como fator de permeabilidade vascular. Estudos posteriores correlacionaram esta proteína com o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), quando passou a ser chamada de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A proteína VEGF tem sido apontada como o principal fator promotor da angiogênese, dentre os vários já conhecidos. Neste trabalho o objetivo foi quantificar a proteína VEGF e correlacionar os resultados com o estadiamento tumoral em amostras de adenocarcinoma colorretal. Foram incluídos 56 adenocarcinomas colorretais, nos quais a detecção da proteína VEGF foi realizada por imunohistoquímica através da construção de uma matriz tecidual e sua quantificação com análise digital de imagens assistida por computador. Nossos resultados não evidenciaram relação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína VEGF e o estadiamento tumoral ou presença e número de linfonodos comprometidos. Baseado no nível de expressão da proteína VEGF não foi possível inferir a presença de linfonodos comprometidos nas amostras analisadas.

Palavras-Chave: VEGF, cólon, câncer

ABSTRACT

Development of studies in molecular biology over last decades have contributed for better knowledge about colorectal carcinogenesis. An important landmark in this process was the identification of a protein with effect on vascular permeability eventually named as vascular endothelial growth factor (VEGF), which seems to be essential for the angiogenesis activation of tumor development. The aim of this study was to assess the VEGF expression and correlate to tumor staging in colorectal cancer. Surgical specimens from 56 colorectal cancer patients were analyzed by immunohistochemistry for VEGF expression using a multitissue array and a computer-assisted image system. No significant result was found between VEGF expression and tumor staging or lymph nodes metastasis. We concluded that no predictive value for lymph nodes metastasis could be demonstrated by VEGF immunostaining in this study.

Key-Words: VEGF, colon, cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo genético para a carcinogênese colorretal.....	17
Figura 2: Extração do tecido para montagem do multibloco	35
Figura 3: Multibloco montado e seu respectivo molde	36
Figura 4: Obtenção das imagens.	39
Figura 6: Demonstração do processamento das imagens	40
Figura 7: Exemplo de imunistoquímica para detecção da proteína VEGF	44

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Estadiamento do câncer colorretal no sistema TNM.	20
Tabela 2: Dados pessoais e histopatológicos.	43
Tabela 3: Valores do escore de expressão da proteína VEGF.	45
Tabela 4: Dados estatísticos obtidos na comparação dos escores com o estadiamento tumoral.	46
Tabela 5: Comparação da expressão da proteína VEGF com a profundidade de invasão tumoral.	46
Tabela 6: Comparação da expressão da proteína VEGF com o número de linfonodos invadidos.	47

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVO.....	12
1 REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 O Câncer	13
1.1.1 O Câncer Colorretal.....	15
1.1.2 O Estadiamento do Câncer Colorretal (sistema TNM)	18
1.2 A Angiogênese e a Proteína VEGF	20
1.3 Os Tumores e a Proteína VEGF	22
1.4 O Carcinoma Colorretal e a Proteína VEGF.....	23
1.5 Análise Computadorizada para Quantificação Imunoistoquímica	28
1.6 Matriz de Amostras Teciduais (<i>Tissue Array</i>).....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Casuística.....	34
2.2 Construção da Matriz de Amostras Teciduais (<i>Tissue Array</i>).....	35
2.3 A Técnica de Imunoistoquímica	36
2.4 A quantificação da reação imunoistoquímica	37
2.4.1 Obtenção das Imagens	38
2.4.2 Determinação do Perfil de Segmentação	38
2.4.3 Processamento das Imagens (quantificação).....	40
3 RESULTADOS	42
4 DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

Estima-se que no ano de 2007 o câncer tenha causado 7,9 milhões de mortes no mundo, representando aproximadamente 13% de todas as mortes ocorridas. O câncer colorretal foi um dos mais prevalentes, representando a terceira causa mais comum, alcançando 677 mil mortes (World Health Organization, 2008). No Brasil as estimativas para o ano de 2008, válidas também para 2009, são de 466.730 novos casos de câncer, destes casos aproximadamente 27.000 podem ter origem colorretal (BRASIL, 2007).

Os estudos em biologia molecular desenvolvidos ao longo das duas últimas décadas possibilitaram grandes avanços no sentido de uma maior compreensão da carcinogênese colorretal. Considerando a existência de estágios intermediários determinados pela presença de pólipos com diferentes graus neoplásicos, Vogelstein e colaboradores realizaram trabalhos pioneiros ao analisar o processo de degeneração da mucosa colônica normal até o surgimento de um carcinoma em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar, demonstrando a ocorrência de um acúmulo de mutações em genes expressando proteínas com ação sobre as divisões celulares, como a APC, k-ras, DCC e p53.

Embora estes conceitos iniciais tenham sido de grande valor, tornou-se logo evidente sua excessiva simplicidade devido à demonstração de que estas proteínas representavam não apenas um número extremamente reduzido de genes/proteínas envolvidas no processo de carcinogênese, mas também contemplavam apenas um aspecto desta, representada pelo distúrbio proliferativo, etapa primordial porém insuficiente para o surgimento da neoplasia invasiva.

Folkman (1971) propôs no princípio da década de setenta a importante participação do desenvolvimento de microcirculação no processo de crescimento tumoral. Denominado como angiogênese, este processo tem sido demonstrado como um fator de grande relevância, uma vez que o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos são necessários para o suporte de oxigênio, nutrientes e também remover moléculas tóxicas. A indução da angiogênese é regulada por várias moléculas que podem ser liberadas por células tumorais, ou células normais, incluindo células endoteliais, células epiteliais, células mesoteliais e leucócitos. Dentre estas moléculas esta um grupo de proteínas chamadas de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), sendo considerado um dos mais importantes fatores de crescimento endotelial e indutor da angiogênese. Esta proteína, provavelmente está ligada ao crescimento tumoral e ao aparecimento de metástases. Sendo assim, supomos que a expressão da proteína VEGF, nos carcinomas colorretais possa apresentar-se de forma diretamente proporcional ao grau de estadiamento tumoral, representado em especial pela presença de metástases linfonodais.

A imunoistoquímica tem sido empregada como técnica padrão para a identificação da expressão e quantificação tecidual de proteínas, sendo hoje uma ferramenta básica nos estudos de biologia molecular. Utilizada usualmente na prática clínica através da análise de espécimes individuais em lâminas, estudos realizados ao longo dos últimos anos tem a associado com a técnica Matriz de Amostras Teciduais (*Tissue Array*) através da qual podemos agregar múltiplas amostras de diferentes tecidos em uma mesma lâmina. A quantificação imunoistoquímica normalmente é realizada por observadores (semiquantitativa), porém a quantificação via análise de imagens assistida por computador vem se tornando popular no meio científico.

OBJETIVO

Verificar a hipótese de que os níveis de expressão imunohistoquímica da proteína VEGF nos carcinomas colorretais são superiores nos tumores com presença de metástase em linfonodos regionais, utilizando-se uma Matriz de Amostras Teciduais e análise de imagens assistida por computador.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O Câncer

Um essencial componente da vida celular é a capacidade de produzir cópias de si mesma, devendo estas serem realizadas com grande fidelidade. Para que isto ocorra uma abrangente maquinaria molecular de controle do ciclo celular é acionada e a elucidação do funcionamento deste complexo mecanismo está apenas no início. A existência de uma múltipla sinalização intracelular e extracelular torna este estudo extremamente complexo, sendo que a maior parte deste conhecimento é derivado de modelos sistêmicos indutores da carcinogênese em animais (DEVITA, HELMAN, ROSEMBERG, 1997).

Para a biologia celular o câncer tem uma importância singular. A família de doenças agrupadas com este nome mostra distúrbios das regras fundamentais do comportamento celular em um organismo multicelular. Nas células somáticas a mutação, a competição e a seleção natural são os ingredientes básicos do câncer. As células individuais e mutantes prosperam a custa das células vizinhas, levando o tecido a um colapso, destruindo toda a sociedade celular (ALBERTS, 1997).

Nos últimos quinze anos, tem havido uma revolução no conhecimento da gênese do câncer humano. Sua natureza genética foi estabelecida através da identificação de genes e suas mutações, cuja contribuição funcional no aparecimento do câncer tem sido bem definida (FENOGLIO-PREISER, 1998).

A divisão celular é um fator crítico na mutagênese e tecidos com uma baixa taxa de mitose possuem uma pequena incidência de câncer. As mutações podem ocorrer durante a duplicação do DNA, entretanto do ponto de vista mutagênico a enzima DNA polimerase comete erros com uma frequência muito baixa, sendo desprezíveis no processo da carcinogênese. Produtos do metabolismo celular ou agentes mutagênicos externos podem provocar lesões no DNA, sendo mais comuns que os erros causados pela DNA polimerase. Tanto as lesões como os erros na duplicação do DNA, podem ser corrigidos por mecanismos de reparo existentes nas células. Eventuais falhas nestes mecanismos podem permitir que erros ou lesões sejam transmitidos para as células filhas, resultando em mutações (ROSSI, 1999).

Uma só mutação não é suficiente para o aparecimento da célula cancerígena. Evidências demonstram que como regra geral, vários, raros e independentes acidentes causadores de mutações são necessários para a gênese de uma célula tumoral. Além disto, o desenvolvimento de tecidos progressivamente indiferenciados possibilita o acúmulo de novas mutações, as quais podem inclusive variar dentro do próprio tecido tumoral (ALBERTS, 1997).

Estudos recentes sugerem que a renovação celular dos tecidos se inicia em um grupo de células especiais, denominadas como *células tronco*, as quais apresentam um ciclo de vida bastante longo, podendo aparentemente atingir anos. Acredita-se hoje que isto ocorra inicialmente através da formação de um tipo especial de células denominadas como progenitoras ou transitórias, as quais irão por seu turno gerar as linhagens diferenciadas de células maduras. Em decorrência desta longevidade, estas *células tronco* são provavelmente aquelas capazes de acumular mutações, as quais

irão então dar origem a uma população de células tumorais contendo um ganho proliferativo, sendo então denominadas como *células tronco tumorais*.

1.1.1 O Câncer Colorretal

Os tumores gastrointestinais são responsáveis por uma grande fração dos tumores humanos (DEVITA, HELMAN, ROSEMBERG, 1997). Dentre esses o câncer colorretal é terceira causa mais comum de câncer no mundo, em ambos os sexos, sendo a segunda em países desenvolvidos (BRASIL, 2007). Exibe amplas variações geográficas na sua frequência, sendo mais comum na região oeste da Europa, na América do Norte, na Nova Zelândia e na Austrália. Estudos epidemiológicos japoneses demonstraram que entre 1967 e 1971 o índice de casos de câncer de cólon era de 5.6 a cada cem mil habitantes. Um novo levantamento feito entre 1983 e 1987, mostrou que este índice mudou para 17.1 casos a cada cem mil habitantes, revelando uma tendência crescente desta doença (FENOGLIO-PREISER, 1998).

Estimativas de casos novos para o ano de 2008 são de 12.490 casos em homens e 14.500 casos em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 novos casos a cada 100.000 homens e 15 para cada 100.000 mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, entre os homens o câncer colorretal é o terceiro mais freqüente na região Sudeste, seguido pelas regiões Sul e Centro-Oeste onde é o quarto mais freqüente. Nas regiões Nordeste e Norte ocupa a quinta e a sexta posição respectivamente. Para as mulheres é o segundo mais freqüente na região sudeste. Nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste é o terceiro mais freqüente enquanto na região norte é o quinto mais freqüente (BRASIL, 2007).

Pinho *et al* (2003) procederam um levantamento retrospectivo de todos os casos de câncer colorretal diagnosticados na cidade de Joinville no período de 1995 a 1999. Foram identificados 251 casos de carcinoma colorretal, representando um percentual de 4,9% em relação ao total de tumores malignos diagnosticados e uma incidência anual de 13,1 novos casos por 100.000 habitantes estando superior à média de novos casos estimados para Santa Catarina (8,4), Região sul (11,64) e Brasil (9,65).

O câncer colorretal está associado principalmente a fatores ambientais e genéticos. Estes dois fatores, provavelmente atuam em pontos diferentes da progressão neoplásica. Estudos envolvendo vários pacientes portadores de câncer colorretal, mostraram que a hereditariedade é muito importante no processo da carcinogênese, sendo este o fator de risco mais importante para esse tipo de neoplasia (FENOGLIO-PREISER, 1998; BRASIL, 2007).

Modelos sugerem que a carcinogênese possui muitas fases, guiadas pela mutação num grupo variado de genes, havendo ainda um relacionamento direto com fatores ambientais específicos (DEVITA, HELMAN, ROSEMBERG, 1997). Uma dieta com base em gorduras animais, baixo consumo de cereais, frutas e outros vegetais, associada ao tabagismo, consumo excessivo de álcool e sedentarismo servem como exemplos de fatores ambientais que elevam o risco para o desenvolvimento do câncer colorretal (BRASIL, 2007).

Neves (2006) demonstrou que as diferenças regionais no Brasil quanto à distribuição da incidência do câncer colorretal, estão diretamente associadas aos hábitos alimentares. O alto consumo de óleos, gorduras e carnes está ligado a taxas mais elevadas da incidência do câncer colorretal. Este autor sugere ainda que a

associação entre o consumo de gordura e esta neoplasia pode estar relacionado à maior excreção biliar e a formação de produtos metabólicos provenientes de lipídios.

O câncer colorretal, na maioria dos casos, tem sua origem em pólipos neoplásicos, inicialmente não invasivos. Esta evolução do aspecto normal da mucosa até o aparecimento de um carcinoma, passa por alterações morfológicas microscópicas e depois macroscópicas. Isto possibilitou avanços no conhecimento da biologia molecular do câncer, principalmente tratando-se do estudo da polipose adenomatosa familiar (PINHO, 2005).

Num estudo realizado com 172 amostras de lesões colorretais, os resultados reforçam a idéia da acumulação de alterações afetando pelo menos um oncogene e vários genes supressores tumorais. Este estudo reforça a idéia da natureza progressiva das alterações genéticas envolvidas na carcinogênese colorretal (VOGELSTEIN, et al, 1988).

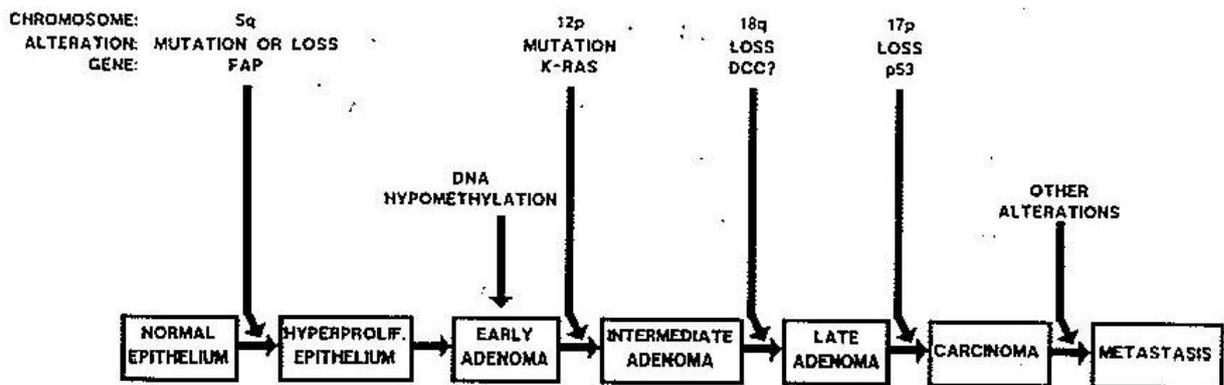


Figura 1: Modelo genético para a carcinogênese colorretal proposto por Fearon e Vogelstein (1990).

Fearon e Vogelstein (1990), em artigo de revisão, relacionaram as principais alterações genéticas do processo de carcinogênese colorretal, envolvendo oncogenes e genes supressores de tumor. A figura 1 mostra um esquema produzido pelos autores

sugerindo que cada alteração ocorre geralmente numa determinada fase da progressão neoplásica, estando possivelmente relacionada com um gene específico.

A mutação ou perda do gene FAP (*familial adenomatous polyposis*), localizado no braço longo do cromossomo 5 ocorre na transição do epitélio normal para epitélio hiperplásico. A hipometilação do DNA transforma o epitélio hiperplásico num adenoma jovem, que associado a mutações no gene K-RAS (*retrovirus-associated DNA sequences*), localizado no braço curto do cromossomo 12, transforma-o num adenoma intermediário. A perda do gene DCC (*deleted in colon carcinoma*) localizado no braço longo do cromossomo 18 faz com que o adenoma intermediário transforme-se em adenoma tardio e sua função, aparentemente é de supressão tumoral. A transição de adenoma para carcinoma foi relacionada com a perda da funcionalidade no gene p53 localizado no braço curto do cromossomo 17. Entretanto a ordem destas mutações pode variar, bem como sua acumulação correlaciona-se com a capacidade do carcinoma para metastatizar e reduzir a sobrevida do paciente.

1.1.2 O Estadiamento do Câncer Colorretal (sistema TNM)

O estadiamento tumoral é o elemento mais importante na avaliação prognóstica do câncer, sendo hoje estabelecida internacionalmente a utilização do sistema TNM, o qual classifica os tumores através pela extensão anatômica local e à distância, determinada clínica e histopatologicamente. A letra “T” do sistema corresponde ao nível de invasão local do tumor, a letra “N” à presença e extensão de metástases em linfonodos regionais, enquanto a letra “M” relaciona-se à presença de metástase à distância. A adição de números a essas letras indica a extensão do câncer: T0, T1, T2,

T3, T4; N0, N1, N2 e M0, M1, variando sua definição de acordo com o órgão ou tecido de origem primária do tumor.

No câncer colorretal, a classificação TNM está baseada na profundidade da invasão da parede intestinal, invasão de estruturas adjacentes, número de linfonodos regionais envolvidos e a presença ou ausência de metástase à distância. O câncer colorretal é classificado como TX se o tumor primário não puder ser avaliado, T0 quando não há evidência de tumor primário. Tumores classificados como Tis, são chamados de carcinoma *in situ*, estando restrito à mucosa (intra-epitelial). O T1 invade a submucosa, o T2 alcança a muscular própria, o T3 quando esta é ultrapassada, podendo atingir a sub-serosa ou os tecidos peri-cólicos e peri-retais. O estadiamento T4 corresponde ao comprometimento direto de outros órgãos ou estruturas, assim como as perfurações livres para a cavidade peritoneal.

Os linfonodos regionais são classificados como NX se não puderem ser avaliados, N0 se não houver nenhum linfonodo comprometido, N1 se houverem 1 a 3 linfonodos com metástases e N2 se houverem 4 ou mais linfonodos comprometidos. A metástase à distância é classificada como MX se não puder ser avaliada, como M0 se não for detectada e como M1 se for detectada. Esta classificação quando feita pelo exame histopatológico segue precedido da letra “p” minúscula (pT, pN, pM), sendo dividido em grupos por estádios como mostra a tabela 1.

Tabela1: Estadiamento do câncer colorretal no sistema TNM.

Estádio	Tumor primário	Linfonodos Regionais	Metástase a distância
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1, T2	N1	M0
IIIB	T3, T4	N1	M0
IIIC	Qualquer T	N2	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: BRASIL, 2004.

1.2 A Angiogênese e a Proteína VEGF

Em condições fisiológicas o endotélio vascular é quiescente, com uma taxa de divisão celular muito baixa e com tempo de renovação de centenas de dias. Durante o processo de angiogênese as células endoteliais saem do seu estado quiescente e podem reproduzir-se rapidamente, mas este efeito é focal e curto (DEVITA, HELMAN, ROSEMBERG, 1997).

Acredita-se que quando as células nos tecidos são privadas de oxigênio, estas liberam fatores que induzem a formação de novos capilares. Provavelmente, por esta razão, as células de um vertebrado estão localizadas a pelo menos 50 mm de um capilar (ALBERTS, 1997), sendo que a proliferação e sobrevivência celular dependem de um adequado suprimento de nutrientes, oxigênio e da remoção de moléculas tóxicas.

O processo de angiogênese tem sido alvo de intensos estudos há décadas. É resultado de um equilíbrio entre alguns fatores que estimulam e outros que inibem o crescimento de novos vasos sanguíneos. Em tecidos normais predominam os fatores

de inibição da angiogênese. Nos tecidos neoplásicos há uma mudança no perfil, passando para fenótipos estimuladores (DEVITA, HELMAN, ROSEMBERG, 1997).

A indução da angiogênese é mediada por múltiplas moléculas que regulam o processo de invasão, penetração, proliferação e formação de novos vasos sanguíneos. Aproximadamente quatorze proteínas ligadas a angiogênese já foram sequenciadas e clonadas. Dentre elas podemos citar os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), interleucina-8 (IL-8), angiogenina, angiotropina, fator de crescimento epitelial (EGF), fibrina, nicotinamida, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), etc. (DEVITA, HELMAN, ROSEMBERG, 1997; FERRARA, GERBER, LE-COUTER, 2003).

Além destes fatores citados acima, devemos destacar uma proteína, conhecida como VEGF (*vascular endothelial growth factor*), que atua seletivamente sobre as células endoteliais, estimulando a angiogênese e a permeabilidade vascular em situações diferentes, parecendo ser esta a via utilizada por alguns tumores para aumentar o aporte sanguíneo (ALBERTS, 1997; FERRARA, GERBER, LE-COUTER, 2003).

Originalmente o VEGF foi descrito como fator de permeabilidade vascular (VPF), identificado nos anos 80. Os experimentos de Senger et al (1983) perceberam que o fluido derivado da ascite causada por tumores em cobaias tinha capacidade de rapidamente elevar a permeabilidade microvascular. Atividade similar que também foi secretada quando estas células tumorais e outras linhagens tumorais foram cultivadas in vitro. Este fator, responsável pelo aumento da permeabilidade, foi purificado do líquido ascítico e do meio de cultura de uma linhagem tumoral (10 hepatocarcinoma), compreendendo uma proteína com peso molecular que varia entre 34 a 42 Kda.

Atualmente constitui uma família de glicoproteínas diméricas, pertencentes a uma super família de fatores de crescimento derivados das plaquetas, a qual inclui sete membros denominados como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário (PIGF). Todos os membros desta família possuem um domínio do VEGF comum (HOEBEN *et al*, 2004).

O gene codificante do VEGF-A está no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), constituído por 8 exons separados por 7 introns (PODAR, 2005). O peso molecular do fator VEGF-A, varia entre 34 a 42 kDa e possui uma estrutura dimérica, sendo que os níveis mais altos de expressão em tecidos normais são encontrados no pulmão, rim, coração e glândula adrenal. Em níveis mais baixos porém ainda detectáveis, no fígado, baço e mucosa gástrica. Em humanos, o splicing alternativo do gene codificante do fator VEGF-A, pode gerar até sete isoformas: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ (HOEBEN *et al*, 2004).

1.3 Os Tumores e a Proteína VEGF

O crescimento dos tumores é regulado pela angiogênese e se não fosse invadido por capilares, seu tamanho não passaria de alguns poucos milímetros de diâmetro. Para crescer mais um tumor deve induzir o crescimento endotelial em seu interior, possibilitando a formação de uma rede capilar intra-tumoral. Os sinais gerados pela necessidade de sangue estimulam uma resposta das células endoteliais que inclui pelo menos quatro etapas consecutivas. Inicialmente, as células rompem a lâmina basal que circundam um vaso sanguíneo existente. Em seqüência, as células endoteliais movem-

se em direção ao sinal, devendo em seguida proliferar até a etapa final, quando ocorre a formação dos tubos capilares. (ALBERTS, 1997).

A hipótese de que o crescimento tumoral é dependente da angiogênese foi inicialmente apresentada em 1971 por Judah Folkman. A capacidade tumoral de induzir a angiogênese, independe aparentemente de seu grau de malignidade e há considerável confusão na literatura sobre esta questão. O adenoma adrenal por exemplo, é benigno e altamente angiogênico (FOLKMAN, 1990).

Uma grande variedade de tumores sólidos mostram uma super expressão da proteína VEGF, incluindo carcinomas primários e metastáticos (ELLIS *et al*, 2000). Tumores humanos de mama, pulmão, cérebro, pâncreas, ovário, rim e vesícula, super expressam as isoformas VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ do fator VEGF-A (PODAR, 2005).

Catena *et al* (2007), demonstraram que a isoforma VEGF₁₂₁ é mais abundante em tumores prostáticos do que em amostras de cultura de células de próstata normais. Demonstraram também que este aumento está relacionado com o incremento da angiogênese tumoral.

1.4 O Carcinoma Colorretal e a Proteína VEGF

Diversos trabalhos tem relacionado a proteína VEGF com o crescimento, fatores prognósticos e a sobrevida de pacientes com carcinoma colorretal. Kekec *et al* (2006) utilizando a técnica de imunistoquímica, analisaram oitenta e nove casos de carcinoma colorretal, e destes sessenta e cinco casos (73%) expressaram a proteína VEGF-A. Os pacientes com maior sobrevida (59 meses) apresentaram resultados negativos para

VEGF-A. Os resultados positivos foram separados conforme a intensidade da reação, positivo (+), (++) e (+++). Os pacientes com menor sobrevida (11 meses), tiveram resultados positivo (+++). Entretanto, os resultados da expressão da proteína VEGF, quando comparados com fatores prognósticos conhecidos, tais como, estadiamento e grau de invasão tumoral, invasão da serosa, invasão linfática e metástase à distância não mostraram diferenças estatisticamente relevantes.

Altomare *et al* (2007) avaliou a expressão da proteína VEGF e do fator tecidual (TF), também conhecido como CD142. Utilizando a técnica de imunistoquímica avaliou a mucosa normal e o tecido tumoral de 50 pacientes com câncer colorretal. Estes pacientes foram acompanhados por três anos para verificação da possível recorrência da doença. Ambos os fatores foram detectados em todas as amostras tumorais sendo a expressão da proteína VEGF maior no tecido tumoral que no tecido normal ($p < 0,0001$), resultado este também confirmado com a medição dos mRNA(s). Houve também uma forte correlação entre os níveis de expressão da proteína VEGF e TF ($p < 0,0005$) no tecido tumoral, porém não observada no tecido normal. Não houve correlação estatística dos níveis de expressão das proteínas VEGF e TF com o estágio, grau ou tamanho tumoral. Os níveis do TF não mostraram correlação com o aumento no risco de recorrência. Fato contrário foi observado quando os níveis de expressão da proteína VEGF foi alto, sugerindo este ser um fator de risco independente para a recorrência tumoral.

Zheng *et al* (2003) estudaram a densidade microvascular (MVD) e correlacionaram com a expressão da proteína VEGF. Foram selecionados 97 casos de carcinoma colorretal, submetidos a técnica de imunistoquímica usando anticorpos monoclonais anti-VEGF e anti-fator CD34. Significante correlação foi encontrada entre

MVD e a graduação do carcinoma. Não houve relação significativa entre MVD e idade, sexo e estadiamento tumoral. A MVD foi maior e estatisticamente significativa no grupo positivo para a proteína VEGF. Reação positiva para VEGF foi observada em 68 dos 97 casos estudados. Não foi observada correlação significativa entre a expressão da proteína VEGF e o estadiamento tumoral.

Em estudo realizado por Doger *et al* (2006) foram correlacionadas a expressão da proteína VEGF com a expressão do receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) em 60 casos de carcinoma de cólon, utilizando imunohistoquímica. Os resultados mostraram um tempo de sobrevivência médio de 28,93 (2-52) meses no grupo negativo para EGFR, 23,92 (6-46) meses para o grupo com baixa expressão de EGFR e de 17 (10-40) meses para os pacientes com alta expressão de EGFR. Os casos VEGF negativos tiveram um tempo de sobrevivência médio de 27,50 (4-52) meses, os grupos com baixa e alta expressão da proteína VEGF tiveram uma sobrevida média de 29,33 (6-48) e 14,5 (2-40) meses respectivamente. Com estes dados os autores concluíram que EGFR/VEGF não são indicadores da sobrevida dos pacientes e o valor prognóstico de sua expressão talvez deva ser questionado.

Funaki *et al* (2003) estudaram oitenta e três pacientes com carcinoma colorretal primário. Foram consideradas positivas para a proteína VEGF-D amostras com mais de 10% de células tumorais marcadas. As diferenças nos resultados de expressão da proteína VEGF-D não foram estatisticamente relevantes quando comparadas com o grau histológico, profundidade de invasão do tumor, metástase hepática, metástase peritoneal, invasão linfática ou venosa. Também não houve relevância estatística nas diferenças observadas entre o tempo de sobrevivência dos pacientes positivos e negativos para a proteína VEGF-D. Entretanto, a expressão do fator VEGF-D

correlacionou-se significativamente com a presença de metástase em linfonodos, sendo um fator independente. Cinquenta e um casos não possuíam metástases em linfonodos, sendo que destes apenas nove mostraram positividade para VEGF-D. Em trinta e dois casos havia metástase em linfonodos e destes dezessete mostraram positividade para VEGF-D ($p < 0,01$).

Outro estudo realizado por Takahashi *et al* (1995) avaliou a expressão da proteína VEGF e seu receptor KDR, bem como o fator VIII para contagem de vasos sanguíneos. Foram incluídos 52 casos de carcinoma de cólon (24 com metástase e 28 sem metástase) e 10 adenomas. A intensidade da reação para detecção da proteína VEGF foi significativamente maior nos tumores com metástase do que nos tumores sem metástase e adenomas ($p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente). Porém não houve diferença entre a intensidade de coloração dos tumores sem metástase e os adenomas. A presença da reação positiva para o receptor KDR foi mais freqüente nos casos com metástase que nos sem metástase ($p = 0,02$), novamente pequenas diferenças foram observadas entre adenomas e carcinomas sem metástase. A contagem dos vasos sanguíneos correlacionou-se com a expressão da proteína VEGF, tanto no interior do tumor ($p < 0,05$) como na borda invasiva ($p < 0,001$). Esse achados suportam a hipótese que a proteína VEGF é um importante fator angiogênico nos casos de carcinoma de cólon primários e metastáticos. A avaliação da expressão da proteína VEGF e a contagem de vasos podem servir de auxílio para detecção de pacientes com risco de desenvolverem metástases originárias do carcinoma de cólon.

Kazama *et al* (2004) estudou a expressão da proteína VEGF-C em 79 adenomas de cólon, 8 adenomas com carcinomas *in situ* e em 85 carcinomas invasivos de cólon. Uma forte coloração foi obtida em 70 dos 79 adenomas, entretanto a coloração foi focal

em todos os casos e não houve correlação com o grau de displasia ou o tamanho dos adenomas. Em 6 amostras dos adenomas com carcinoma in situ a região carcinomatosa mostrou uma região positiva para a proteína VEGF-C maior que na região adenomatosa. Das 85 amostras de carcinoma invasivo 83 foram claramente positivas para a proteína VEGF-C. Foram observadas em 40% das amostras positivas aspecto focal de coloração e em 60% aspecto difuso de coloração. Nos carcinomas invasivos a expressão da proteína VEGF-C correlacionou-se significativamente com invasão linfática, metástase em linfonodos e tamanho tumoral. Não houve correlação com invasão venosa e metástase hepática. O tempo de sobrevida tendeu a ser menor no grupo com forte expressão da proteína VEGF-C, porém essas diferenças não foram estatisticamente relevantes quando comparadas com o grupo de baixa expressão.

Atualmente há poucas dúvidas de que a família VEGF tem um papel importante na regulação da angiogênese embrionária e pós natal. A inibição de VEGF inibe a angiogênese patológica numa ampla variedade de modelos tumorais. Este aspecto leva ao desenvolvimento farmacológico de drogas que tenham como alvo a regulação deste fator. Parece haver consenso entre os estudiosos a respeito da importância da proteína VEGF no crescimento de tumores em geral, incluindo o câncer colorretal. Apesar disso ainda há grande discordância quanto a correlação da expressão da proteína VEGF e o estadiamento tumoral, bem como sua correlação com a presença e a ausência de metástases em linfonodos e a distância.

1.5 Análise Computadorizada para Quantificação Imunoistoquímica

Na medida em que os anos passam, novas biomoléculas são identificadas e correlacionadas às mais diversas patologias existentes. Baseado neste contexto faz se também necessário o conjunto aperfeiçoamento das técnicas e equipamentos para a correta identificação e quantificação destas biomoléculas. A técnica de imunoistoquímica vem há muito sendo utilizada na detecção e quantificação de antígenos/marcadores, que podem ser utilizados, por exemplo, na subtipagem e prognóstico de neoplasias.

Os métodos padrão para medição da expressão de antígenos numa reação imunoistoquímica são semiquantitativos, geralmente levando em consideração e extensão e a intensidade da coloração obtida. Sannino e Shousha (1994) quantificaram a expressão de receptores de estrogênio (ER) em carcinomas mamários. Utilizaram cinco categorias para graduação da expressão, variando do negativo (-) até o fortemente positivo (++++). O percentual de células coradas foi dividido em: ocasionais células coradas/menos que 1/3 (escore 1); menos que 2/3 de células tumorais coradas (escore 2) e mais que 2/3 de células coradas (escore 3). A intensidade da coloração foi dividida em: moderada (escore 1) e intensa (escore 2). Portanto foram considerados como negativos (-) casos sem a marcação para ER; positivos (+) quando ocasionais células foram observadas; positivo (++) quando ocasionais células com intensidade moderada (escore 1X1); positivo (+++) quando o escore variar entre 2 e 4; e positivo (++++) quando o escore for 6.

Outra forma de se realizar a quantificação das reações imunoistoquímicas é o processamento de imagens assistida por computador. Hernandez-Blazquez *et al* (2000)

avaliaram o grau de metilação do DNA de 13 pacientes submetidos à cirurgia para extração de carcinoma colorretal. A quantificação da reação imunoistoquímica para detecção da proteína 5-methylcytidine foi realizada em áreas de tecido normal e cancerígeno. Os núcleos morfológicamente alterados exibiram pontos densos dentro de áreas fracamente coradas. Os núcleos normais exibiram coloração densa, escura e uniforme. A análise das imagens possibilitou calcular a densidade óptica média de ambos os tecidos, demonstrando constante e significativa menor intensidade nas amostras neoplásicas.

Foi desenvolvido no Departamento de Medicina da Universidade de Washington, em trabalho realizado por Underwood *et al* (2001), um sistema de análise de imagens assistida por computador baseado na subtração de cor, batizado como CS-CAIA. Segundo este grupo de pesquisadores, a quantificação das reações imunoistoquímicas pelos métodos tradicionais tende a ser difícil, exige múltiplos observadores e geram dados qualitativos. Para desenvolver o método CS-CAIA, segmentos cutâneos de camundongos diabéticos (db/db) e de seu tipo selvagem da mesma ninhada (db/-) foram corados por imunoistoquímica para o marcador neural PGP 9.5 (protein gene product 9.5). As áreas positivamente coradas foram isoladas da coloração de fundo com a utilização de um protocolo previamente determinado. A coloração remanescente teve determinado o número de regiões coradas, a fração de área corada e a densidade da área medida. Os resultados mostraram que o sistema CS-CAIA é eficiente para contagem dos nervos epidérmicos, medir a fração de área corada e a sua densidade, e que as diferenças apuradas foram significativamente menores no camundongos db/db quando comparados aos camundongos db/-.

Marks *et al* (2008) do Departamento de Pós-graduação em Cirurgia Experimental da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) estudaram os efeitos da modulação do inositol hexafostato (IP6). Utilizaram a técnica de imunistoquímica para marcador biológico de apoptose, num modelo de carcinogênese de cólon induzida por azoximetano (AOM). Foram utilizado 112 ratos wistar, distribuídos em 4 grupos. Grupo A (controle), grupo B (AOM 5 mg/Kg⁻¹, 2x a partir da 3 semana), grupo C (IP6 em água a 1%) e grupo D (IP6+AOM). A quantificação da imunexpressão para o marcador inositol 1,4,5 triphosphate receptor type III (Itp3) foi realizada com o uso de processamento de imagem assistida por computador. Foram capturadas 10 imagens de cada amostra, centrando sempre as criptas. Utilizando o software Image Lab™ e o método duplo-cego, foi quantificada a densidade da coloração marrom, correspondente à expressão da proteína Itp3 em percentual de área (com filtro RGB, fundo azul e intervalo de cor 0 a 147). Os resultados mostraram significativa diferença entre os grupos na expressão da proteína Itp3 sendo que o inositol hexafosfato promove a modulação deste marcador na carcinogênese do cólon.

Rieux *et al* (2002) compararam a análise de imagens para obtenção da densidade óptica e a contagem por observação visual de células coradas para o produto do proto-oncogene c-fos (proteína Fos) no núcleo supraquiasmático. A contagem de células por observação visual foi mais subjetiva devido aos valores limiares não serem precisamente definidos e variaram conforme o observador, iluminação, intensidade da reação ou outros fatores. Por outro lado a medição da densidade óptica é mais objetiva e pode ser realizada com mais parâmetros, condições de iluminação e o limiar (*cut off*) pode ser mantido constante durante todo o experimento. Estes autores concluíram que a análise computadorizada de imagens é

um método preciso e rápido para determinar a quantidade da proteína Fos no núcleo supraquiasmático, possibilitando compreender os mecanismos envolvidos no ciclo circadiano.

Diaz *et al* (2004) também realizaram um estudo comparativo entre o método manual (semiquantitativo) e o processamento de imagens assistida por computador. Utilizaram neste estudo 70 amostras de carcinoma mamário invasivo corados pela técnica de imunohistoquímica para o receptor de estrogênio (ER). A reação foi quantificada por três patologistas e os escores obtidos foram comparados usando o sistema *QCA image-analysis* (Lake Bluff, IL), utilizando 10% com nível de corte para positividade. O escore de consenso dos patologistas foi altamente comparável com os escores determinados pelo sistema QCA (Kappa= 0.84) podendo este último ser utilizado na quantificação imunohistoquímica da expressão do receptor de estrogênio.

Carai *et al* (2002), usando o software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, USA), baseado no processo de segmentação de cor, que visa identificar e isolar determinadas estruturas, baseadas na sua cor, quantificaram a fibrose pulmonar. Amostras pulmonares de dez pacientes com diferentes patologias e vários graus de fibrose pulmonar foram submetidas à coloração de Masson. Os resultados dos componentes identificados (área, tecido e fibrose) foram estatisticamente relevantes e suportam a hipótese que a distribuição da fibrose depende da relativa quantidade de tecido e ao mesmo tempo atesta a precisão do método. Baseado nestes resultados, o método adotado pode ser utilizado nos trabalhos anátomo patológicos e na patologia forense, tornando mais objetiva e reproduzível a quantificação da fibrose pulmonar em amostras de autópsias ou biópsias.

Johansson *et al* (2001) avaliaram as diferenças na quantificação do infiltrado leucocitário em imagens com alta (100X) e baixa (12.5X) magnificação usando o software Image-Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, USA). Neste estudo foram utilizados 344 ratos, implantados com células do modelo de tumor cerebral N32, e após 10 dias, imunizados com células que expressam interferon- γ , com detecção do infiltrado leucocitário por imunistoquímica. Os resultados gerados por ambas as magnificações não mostraram diferenças significativas e permitem eficiente e reproduzível método para avaliar grandes fragmentos de tecido, reduzindo o tempo de trabalho, necessitando apenas de equipamentos comuns aos laboratórios.

1.6 Matriz de Amostras Teciduais (*Tissue Array*)

As técnicas de rotina em histologia permitem somente uma amostra por lâmina. Houve então a necessidade de desenvolver técnicas para aumentar o número de amostras por lâmina (KRAAZ, RISBERG, HUSSEIN, 1998).

A expressão matriz tecidual ou matriz de amostras teciduais (*tissue array/multitissue array*) faz referência a técnicas com objetivo de agrupar múltiplas amostras em uma mesma lâmina. Em 1986 Batiffora descreveu uma metodologia que tornou-se conhecida como "multitumor (sausage) tissue block", que traduzido para português significaria bloco tecidual multitumoral (em forma de salsicha). Este aparenta ter sido o princípio de vários e diferentes procedimentos já descritos, cujo objetivo comum é otimizar o uso de múltiplas amostras.

Apresenta grandes vantagens referentes à uma redução de custos (economia de reagentes e tempo do pesquisador) e possibilita uma melhor análise comparativa devido à homogeneidade da técnica realizada e da comparação dos tecidos numa mesma lâmina (KONONEN *et al*, 1998; ERGUÍLUS *et al*, 2006).

Em 1988 foi descrita a técnica de multibloco pelos pesquisadores KRAAZ, RISBERG e HUSSEIN, a qual apresenta a grande vantagem de não necessitar equipamento especial para ser realizada, ampliando sua aplicabilidade e com importante redução de custos. Nesta técnica, lâminas de rotina do laboratório de patologia foram utilizadas como orientação para seleção de áreas representativas dos tumores. As áreas correspondentes nos blocos de parafina foram retiradas com o auxílio de um "punch" para biópsia de pele. Multiblocos contendo diferentes tipos de tecidos, tumores ou amostras foram montados usando parafina derretida, sempre registrando a posição de cada amostra.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

Trata-se de um estudo retrospectivo onde foram selecionados espécimes resultantes de 62 ressecções cirúrgicas colorretais com diagnóstico de adenocarcinoma, entre os anos de 2004 a 2008. Essas amostras encontravam-se arquivadas em blocos de parafina, disponíveis no Laboratório de Anatomia Patológica SIP, localizado na cidade de Joinville, Santa Catarina, . As amostras foram numeradas e os nomes dos pacientes não foram utilizados, mantendo-se o sigilo. Esta amostragem foi subdividida em dois grupos, a saber: grupo A - adenocarcinomas colorretais classificados como Estádio I e II pela classificação TNM, ou seja, aqueles nos quais não foi identificada a presença de invasão neoplásica em linfonodos; grupo B - adenocarcinomas colorretais classificados como Estádio III, ou seja, aqueles nos quais foi identificada a presença de no mínimo um linfonodo comprometido pelo tecido neoplásico. Foram incluídas apenas as amostras com estadiamento tumoral completo pela classificação TNM e cujos blocos de parafina contendo tecido tumoral mostraram-se adequados à realização do presente estudo.

2.2 Construção da Matriz de Amostras Teciduais (*Tissue Array*)

Após a seleção dos casos, foram escolhidos os blocos de parafina mais representativos do espécime tumoral baseado na análise de sua lâmina correspondente corada com Hematoxilina e Eosina (HE). Foi feita uma revisão microscópica desta para identificação dos segmentos com tecido tumoral (figura 2A), dos quais foi extraída uma amostra do bloco de parafina correspondente com a utilização de um "punch" descartável para biópsia de pele, com 5 mm de diâmetro (figura 2B). Multiblocos destes fragmentos de amostras foram montados, sempre registrando a posição de cada um para posterior identificação (figura 3).

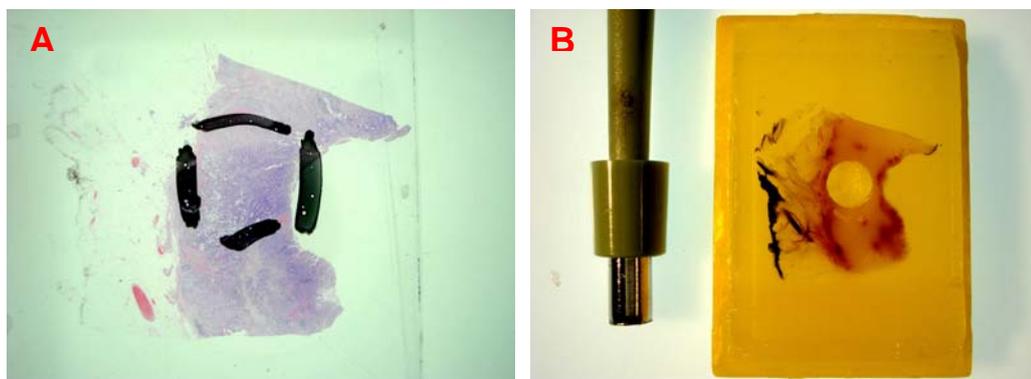


Figura 2: Extração do tecido para montagem do multibloco: A) Lâmina de amostra tumoral, corada com HE para servir como referência na seleção da área tumoral de interesse. B) Bloco de parafina correspondente à lâmina de HE, cuja amostra já foi retirada com o auxílio do "punch" descartável para biópsia de pele.



Figura 3: Multibloco montado e seu respectivo molde. O tecido no canto superior direito foi colocado como marcador da primeira amostra da matriz e não pertence às amostras do estudo.

2.3 A Técnica de Imunoistoquímica

De cada multibloco foi realizado um corte histológico o qual foi fixado em lâmina de vidro previamente tratada com silano (3-Aminopropyl triethoxysilane, Sigma-Aldrich). Após a completa secagem das lâminas os cortes foram desparafinados em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos e por mais 10 minutos em outro banho de xilol a temperatura ambiente para a completa remoção da parafina. A rehidratação foi realizada em dois banhos de álcool absoluto, dois banhos de álcool etílico e por fim em água destilada.

A recuperação antigênica foi efetuada com tampão citrato 10mM pH 6,0 (solução recuperadora). As amostras foram completamente mergulhadas na solução recuperadora, previamente aquecida a 95°C em banho-maria. Após permanecerem por 15 minutos a 95°C a solução recuperadora foi retirada do banho-maria para um

resfriamento de 25 minutos. Então as lâminas foram lavadas em água destilada e tratadas por 30 minutos com uma solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol para bloqueio da enzima peroxidase endógena. O bloqueio da biotina endógena foi realizado com a permanência das lâminas por 10 minutos numa solução de leite magro desnatado a 3%.

A incubação com o anticorpo primário foi realizada à temperatura ambiente por duas horas. Foi utilizado um anticorpo primário monoclonal, para detecção das proteínas do grupo VEGF de origem humana. A diluição utilizada foi de 1/250 em tampão PBS contendo 1% de albumina bovina. A marca do anticorpo utilizado foi Affinity BioReagents cujo número de catálogo é MA1-16629.

A detecção do anticorpo primário foi realizada com o sistema LSABTM+ System-HRP do fabricante Dako (código K0690) e os tempos de incubação foram praticados conforme instruções do fabricante. A visualização foi obtida com o kit DAB+ Substrate Chromogen System do fabricante Dako (código K3468).

2.4 A quantificação da reação imunoistoquímica

A quantificação da reação imunoistoquímica foi realizada através da análise de microfotografias das amostras, auxiliada pelo software Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA). Conforme instruções do manual do software utilizado, esta quantificação foi dividida em três etapas: Obtenção das imagens (três imagens por amostra); determinação do perfil de segmentação; e processamento das imagens.

2.4.1 Obtenção das Imagens

Usando idênticas configurações de microscopia e fotografia, foram obtidas três imagens, correspondentes a três campos de cada amostra estudada (conforme mostrado na figura 4). As fotos foram obtidas com a objetiva de 40 vezes em microscópio Nikon, modelo Eclipse E200, e com sistema de foto documentação composto pela máquina fotográfica Nikon Coolpix P5000. Com o software Microsoft PhotoEditor as imagens foram tratadas (auto balanceadas) para melhorar o contraste e o brilho das imagens.

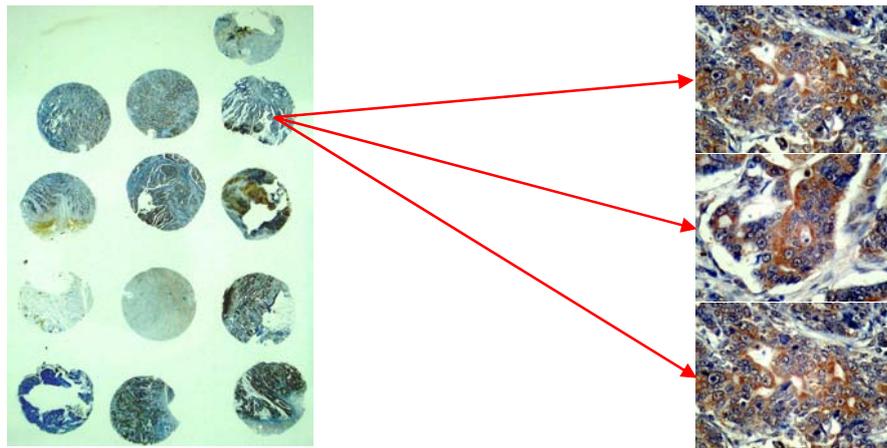


Figura 4: Obtenção das imagens: Lâmina de multibloco submetida à detecção da proteína VEGF juntamente com as três imagens obtidas de uma das amostras.

2.4.2 Determinação do Perfil de Segmentação

Realizar a segmentação das imagens significa identificar e isolar determinadas estruturas, baseadas na sua cor, que podem ser processadas/medidas. Para

determinação do perfil de segmentação foi utilizado um dos casos deste estudo com expressão imunoistoquímica positiva para a proteína VEGF.

No menu "process", função "segmentation", utilizando o modelo RGB (*red*, *green* e *blue*), com o auxílio da tecla "capturar cor" foi realizada a seleção dos pixels que compõem as áreas positivamente coradas dentro da escala de tons pré-determinada para a coloração desejada (marrom, nos casos em questão).

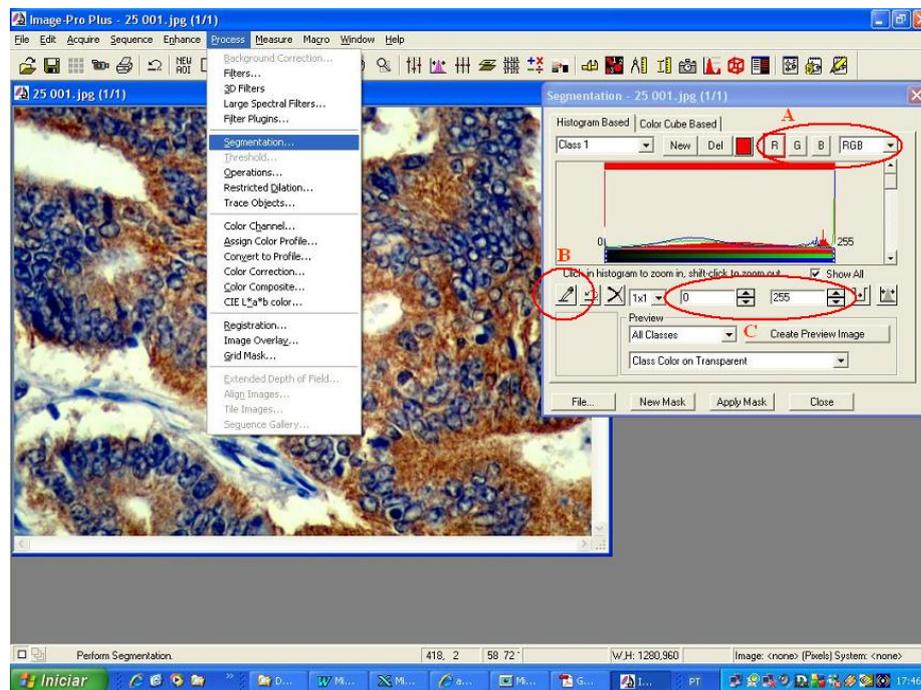


Figura 5: Demonstração do processo de segmentação. Letra A: Seleção do modelo RGB; Letra B: Função "capturar cor"; Letra C: campo para exibição do perfil de segmentação.

Este perfil corresponde à importância/quantidade que cada cor do modelo RGB deverá ter, determinando assim, automaticamente, se o pixel faz ou não parte da área de interesse. Para o vermelho a amplitude foi de 87 até 203, para o verde foi de 15 a 165 e para o azul de 0 a 121. Este perfil foi salvo e utilizado como padrão em todas as imagens avaliadas. Este processo está ilustrado na figura 5. A letra "A" corresponde ao

modelo utilizado na segmentação. A letra "B" mostra a tecla cuja a função é capturar as cores de interesse e a letra "C" ao final do processo mostrará o perfil selecionado para cada uma das cores do modelo RGB.

2.4.3 Processamento das Imagens (quantificação)

Cada imagem foi processada individualmente, utilizando-se o perfil de segmentação padronizado para a quantificação das reações imunoistoquímicas descrito no tópico anterior. As medições foram efetuadas pela função "Count/Size" do menu "Measure" (figura 6) e então exportadas para o software excel.

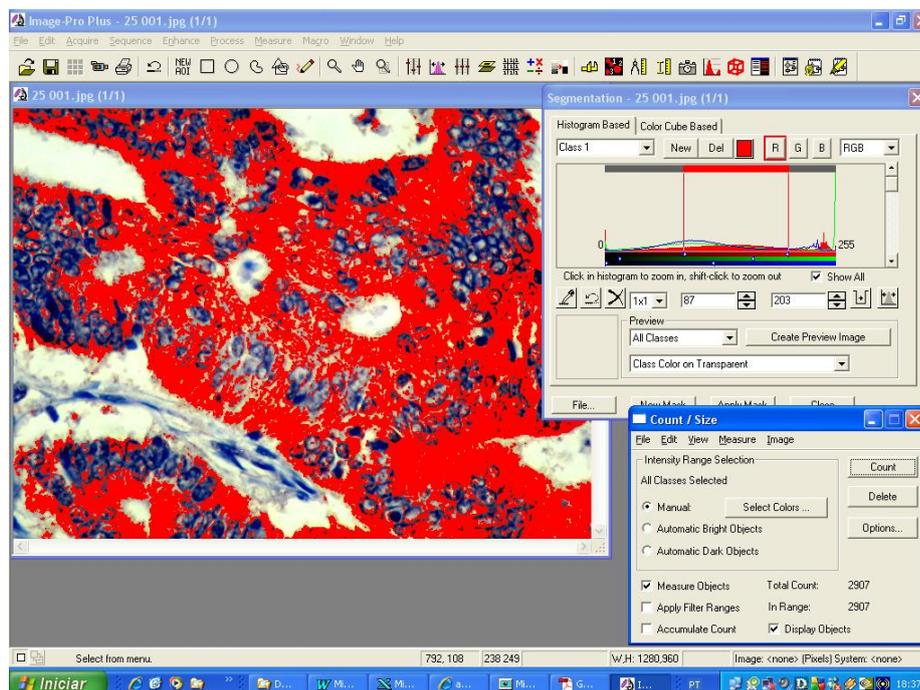


Figura 6: Demonstração do processamento das imagens. Após carregar o perfil de segmentação as áreas de interesse ficam marcadas em vermelho, sendo então avaliadas/medidas ao clicar na tecla "Count".

As três imagens obtidas de cada amostra foram submetidas a este processo, tendo a determinação do nível (escore) de expressão da proteína VEGF obtido pela multiplicação da densidade média pelo percentual das áreas positivamente coradas pela imunistoquímica (áreas de coloração marrom). A obtenção do escore final de expressão da proteína VEGF para cada amostra foi obtida através da média aritmética entre o resultado individual de cada uma das três imagens das amostras.

2.5 Análise Estatística

O software Epi Info™ versão 3.5.1 foi utilizado para efetuar as análises estatísticas deste trabalho. As comparações foram efetuadas com o teste ANOVA ou com o teste Mann-Whitney/Kruskal-Wallis quando as variáveis não estavam normalmente distribuídas. As variáveis categóricas foram analisadas usando-se o teste χ^2 ou o exato de Fisher.

O projeto deste trabalho foi analisado pelo do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Região de Joinville - UNIVILLE, e teve sua execução aprovada pelo ofício nº 103/2007 por atender plenamente aos parâmetros descritos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

3 RESULTADOS

Das 62 amostras selecionadas, somente 56 foram incluídas neste estudo. Quatro amostras foram excluídas devido a fragmentação do material e duas foram excluídas devido a insuficiência de tecido para análise. Das amostras restantes, 28 pertencem ao grupo A (sem metástase em linfonodos) e 28 pertencem ao grupo B (com metástase em linfonodos), sendo os dados demográficos e histopatológicos apresentados na tabela 2. A distribuição por sexo ficou em 29 pacientes (51,8%) para o sexo masculino e 27 pacientes (48,2%) para o sexo feminino. No grupo A, 16 pacientes (57,1%) são do sexo masculino e 12 pacientes (42,9%) do sexo feminino. O grupo B possui 13 pacientes (46,4%) do sexo masculino e 15 pacientes (53,6%) do sexo feminino. Não houve diferença estatística significativa entre a frequência de ambos sexos dentro dos dois grupos de amostras ($p= 0,42$).

A média de idade dos pacientes do grupo A foi de 63,2 (43 - 98) anos e do grupo B foi de 60,5 anos (23 - 93). Não houve diferença estatística significativa entre as idades de ambos os grupos ($p= 0,48$).

Tabela 2: Dados pessoais e histopatológicos. Grupo A (linfonodos negativos) e grupo B (linfonodos positivos).

	Grupo A	Grupo B	Valor de p
Sexo			
Masculino	16	13	p= 0,42
Feminino	12	15	
Idade Média			
	63,2	60,5	p= 0,48
Estadiamento			
I	7		
IIA	20		
IIB	1		
IIIA		2	
IIIB		16	
IIIC		10	
Profundidade do Tumor			
pT2	7	1	
pT3	20	23	
pT4	1	4	
Linfonodos Invadidos			
pN0	28	-	
pN1		17	
pN2		11	

Dentre as 56 amostras estudadas, o estágio I foi representado por sete amostras, o estágio IIA representado por 20 amostras e o estágio IIB por uma amostra. O estágio IIIA por duas amostras o IIIB com 16 amostras e o estágio IIIC com 10 amostras. A profundidade de invasão tumoral predominante foi a de nível pT3, somando 43 amostras das 54 estudadas. Os níveis pT2 e pT4 foram representados por oito e cinco amostras respectivamente. O nível pT1 não ocorreu em nenhuma amostra. Considerando o número de linfonodos comprometidos, 28 amostras foram classificadas como pN0 (amostras referentes ao grupo sem linfonodos comprometidos), 17 amostras

como pN1 (um a três linfonodos comprometidos) e 11 amostras foram classificadas como pN2 (mais de quatro linfonodos comprometidos).

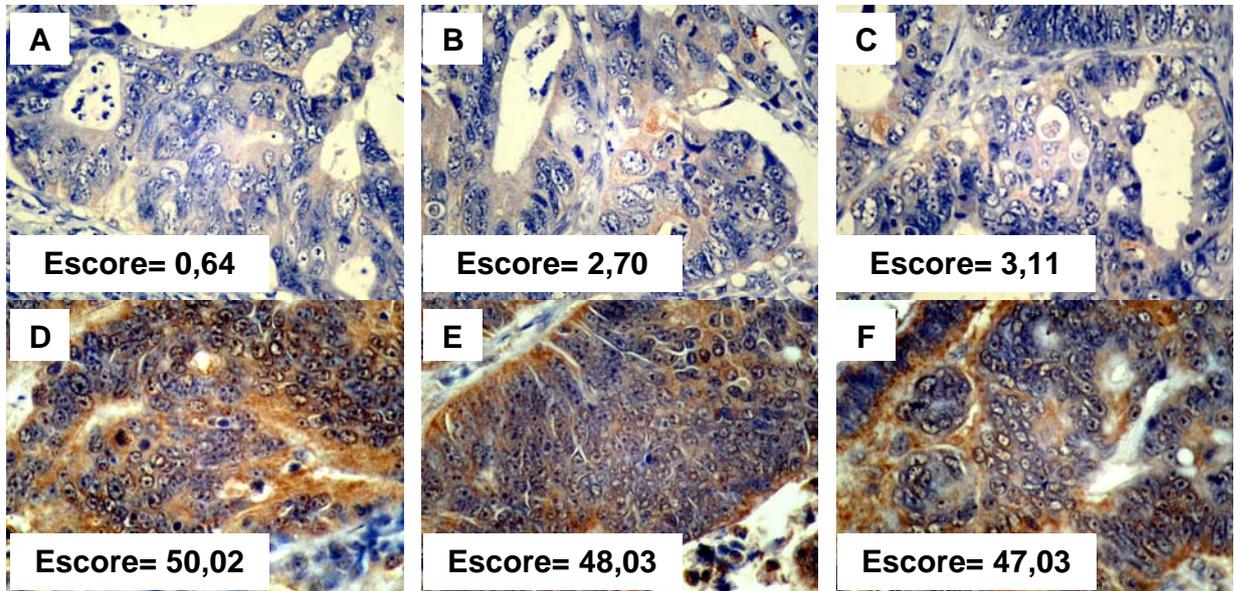


Figura 7: Exemplo de imunohistoquímica para detecção da proteína VEGF: Fotos A a C: caso nº 1, escore médio de 2,15. Fotos D a F: caso nº 56, escore médio 48,36.

Os escores obtidos na avaliação da expressão da proteína VEGF das 56 amostras deste estudo variaram de 2,15 até 48,36 (figura 7).

No grupo A o menor valor de escore foi de 2,15 e o maior 42,83, com uma média de 24,49 e um desvio-padrão de 10,91. No grupo B o menor valor de escore foi de 7,86 e o maior 48,36, com uma média de 24,42 e desvio-padrão de 9,88. As variações entre os escores obtidos nos grupos A e B não foram estatisticamente significativas ($p= 0,98$) e os valores de cada caso podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Valores do escore de expressão da proteína VEGF. Os dados estão ordenados de forma crescente e separados por grupo.

Grupo A n= 28		Grupo B n= 28	
Nº do exame	Escore médio	Nº do exame	Escore médio
1	2,15	29	7,86
2	4,33	30	10,38
3	10,80	31	13,93
4	11,74	32	14,60
5	11,98	33	14,73
6	13,33	34	16,07
7	18,12	35	17,42
8	18,61	36	17,51
9	19,08	37	18,20
10	20,73	38	18,28
11	21,84	39	20,21
12	22,01	40	20,45
13	23,26	41	20,64
14	24,05	42	20,71
15	24,95	43	23,23
16	26,40	44	24,66
17	26,93	45	25,07
18	27,47	46	26,98
19	28,63	47	28,54
20	28,99	48	29,11
21	30,64	49	29,85
22	33,78	50	31,62
23	34,40	51	34,46
24	36,96	52	35,19
25	39,90	53	35,54
26	40,08	54	35,97
27	41,63	55	44,10
28	42,83	56	48,36
Média	24,49	Média	24,42
Desvio-padrão	10,91	Desvio-padrão	9,88
p= 0,98			

Conforme o estadiamento tumoral, o menor escore pertenceu ao estágio I e o maior ao estágio IIIC. Apenas uma amostra foi classificada como estágio IIB com um escore de 34,40. O estágio IIIA foi representado por duas amostras, com uma média de

19,65. Como pode ser observado na tabela 4 entre as amostras restantes, a menor média de escore pertence aos casos classificados como estágio I (23,16). A maior média de escore pertence aos casos classificados como estágio IIIC (26,63). Aparentemente há uma diferença entre média do escore de expressão das amostras classificadas como estágio I e estágio IIIC, entretanto estatisticamente essas diferenças não foram significativas ($p= 0,84$).

Tabela 4: Dados estatísticos obtidos na comparação dos escores com o estadiamento tumoral.

Estadiamento	N	Menor escore	Maior escore	Média	Desvio-padrão	Valor de p
I	7	2,15	40,08	23,16	11,28	0,84
IIA	20	4,33	42,83	24,46	11,09	
IIB	1	34,40	34,40	34,40	-	
IIIA	2	16,07	23,23	19,65	5,06	
IIIB	16	7,86	44,10	23,63	9,90	
IIIC	10	13,93	48,36	26,63	10,74	

Conforme a profundidade da invasão tumoral, a menor média do escore de expressão da proteína VEGF foi de 22,92 e desvio-padrão de 7,06 pertencente aos tumores classificados como pT4. A maior média de escore foi 24,87 com desvio-padrão de 10,75 obtida dos tumores classificados como pT3. O grupo de amostras classificadas como pT2 teve uma média de 23,16 e um desvio-padrão de 10,44. Como pode ser observado na tabela 5 as diferenças observadas nas médias dos grupos separados pela profundidade de invasão tumoral não foram estatisticamente relevantes ($p= 0,86$).

Tabela 5: Comparação da expressão da proteína VEGF com a profundidade de invasão tumoral.

Profundidade do tumor	n= 56	Média	Desvio-padrão	Valor de p
pT2	8	23,16	10,44	0,86

pT3	43	24,87	10,75
pT4	5	22,92	7,06

Divididas as amostras conforme o número de linfonodos comprometidos (tabela 6), o grupo classificado como pN1 (1 a 3 linfonodos comprometidos) exibiu a menor média de expressão da proteína VEGF, ficando em 23,61 com desvio-padrão de 9,59. A maior média foi do grupo classificado como pN2 (4 ou mais linfonodos comprometidos) 25,67 e desvio-padrão de 10,67. O grupo pN0 (sem linfonodos comprometidos) ficou com uma média intermediária de 24,49 e desvio-padrão de 10,91. As diferenças observadas não são relevantes estatisticamente ($p= 0,87$).

Tabela 6: Comparação da expressão da proteína VEGF com o número de linfonodos invadidos.

Linfonodos Invadidos	n= 56	Média	Desvio-padrão	Valor de p
pN0	28	24,49	10,91	0,87
pN1	17	23,61	9,59	
pN2	11	25,67	10,67	

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo representam uma informação adicional dentro do amplo espectro de achados que buscaram relacionar a expressão da proteína VEGF e as diferentes variáveis no câncer colorretal como estadiamento, grau histológico, tamanho do tumor, metástases linfonodais ou à distância e prognóstico.

A ausência de correlação significativa aqui observada entre a expressão tumoral de VEGF, a presença de invasão linfonodal e o estadiamento corrobora outros estudos já efetuados como o de Zheng *et al* (2003), Kekec *et al* (2006) e Altomare *et al* (2007) os quais, embora utilizando metodologias distintas e analisando algumas outras variáveis, também encontraram resultados que não confirmaram a possível relação entre a expressão da proteína VEGF e outros fatores prognósticos padronizados, atualmente utilizados em pacientes portadores de câncer colorretal.

Por outro lado, a controvérsia a este respeito reside na existência de outros estudos os quais lograram evidenciar diferenças significativas relativas à expressão desta proteína. Funaki *et al* (2003), embora não tenha observado relação significativa com diversas variáveis tumorais, demonstrou uma diferença significativa de expressão no que diz respeito à presença de metástases linfonodais. Resultados semelhantes foram encontrados por Kazama *et al* (2004), os quais também encontraram diferença significativa em relação à metástases linfonodais, invasão linfática e o tamanho do tumor. No estudo realizado por Takahashi *et al* (1995) a intensidade da reação para detecção da proteína VEGF foi significativamente maior nos tumores com metástase do

que nos tumores sem metástase e adenomas ($p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente), embora não tenha ocorrido esta diferença entre a intensidade de coloração dos tumores sem metástase e os adenomas. Cascinu *et al* (2000), após estudarem a expressão da proteína VEGF em 121 pacientes com carcinoma colorretal, todos classificados em estágio II, comprovaram a idéia de que a proteína VEGF pode ser utilizada para identificar pacientes com alto risco de recorrência tumoral e que estes poderiam beneficiar-se de um tratamento adjuvante.

A inexistência de consenso a respeito da correlação dos níveis de expressão da proteína VEGF com outros fatores prognósticos contrasta com sua crescente importância clínica. A expressão da proteína VEGF em vários tumores humanos geralmente está correlacionada com a progressão tumoral e prognóstico ruim. Por outro lado a importância da proteína VEGF na angiogênese adulta é diminuída, tornando-a alvo ideal para o desenvolvimento de agentes terapêuticos (DIAZ-RUBIO, 2006).

Nos anos 90 um anticorpo monoclonal contra a proteína VEGF-A, chamado bevacizumab, foi desenvolvido, o qual vem sendo utilizado com resultados bastante promissores (FERRARA *et al*, 2004). Alguns estudos já demonstraram que a adição de bevacizumab à quimioterapia tradicional mostrou aumento da sobrevida dos pacientes com aceitável toxicidade. O FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos aprovou a utilização do bevacizumab em pacientes com tumores de cólon irresssecáveis e tumores de pulmão não escamoso e não de pequenas células, também irresssecáveis. Em abril de 2007 o Ministro Japonês da Saúde, Trabalho e Bem Estar Social aprovou o uso de bevacizumab para tratamento de pacientes com tumores de cólon irresssecáveis (YAMAZAKI, YOSHINO, BOKU, 2007).

Weihrauch *et al* (2008) relataram o caso de um paciente com 62 anos de idade, que teve diagnosticado no ano de 2001 um adenocarcinoma de cólon estágio III. No ano de 2008 apresentou uma grande metástase hepática, irressecável e com linfonodos do hilo hepático envolvidos. Após o tratamento adjuvante com cetuximab, bevacizumab e XELOX (Capecitabine Plus Oxaliplatin) o paciente mostrou completa remissão tumoral. Foi então realizada cirurgia para remoção dos resíduos teciduais que ao serem submetidos ao exame histopatológico não evidenciaram tumor residual.

RNA de interferência (RNAi) é uma tecnologia emergente e potente, capaz de reduzir a expressão de genes desejados. Estudos recentes tem utilizado esta tecnologia para controlar a expressão da proteína VEGF em diversos modelos tumorais. A utilização do RNAi não está em fase tão avançada como o bevacizumab, porém resultados recentes mostram que esta tecnologia é bastante eficiente no controle da expressão gênica.

Mulkeen *et al* (2006) testaram a capacidade do RNAi para reduzir a expressão da proteína VEGF em células de câncer de colon. As células transfectadas com o RNAi mostraram um decréscimo de 94% da expressão da proteína VEGF e 67% de decréscimo na proliferação celular. Outro estudo realizado na China por He *et al* (2008) utilizou RNAi para controlar a expressão da proteína VEGF *in vivo* e *in vitro*. A expressão do RNA mensageiro para a proteína VEGF-C e da proteína VEGF-C *in vitro* foi significativamente reduzida (45,3% e 35,3% respectivamente). *In vivo*, quatro semanas após a injeção do RNAi o volume tumoral foi significativamente menor, bem como a incidência de metástase em linfonodos (30%).

Outro aspecto a ser discutido referente ao trabalho aqui apresentado diz respeito à aplicabilidade dos recursos utilizados para análise dos testes de imunoistoquímica, os

quais incluíram a elaboração de uma matriz de amostras teciduais e a leitura dos resultados utilizando a análise de imagens assistida por computador.

Nossa experiência com a construção de uma matriz de amostras teciduais para a análise conjunta retrospectiva de uma série de casos através de imunistoquímica confirmou os relatos favoráveis encontrados na literatura. Além de tecnicamente simples e viável, sua utilização implicou em diversos benefícios entre os quais poderíamos citar em especial a possibilidade de um maior controle de variações na coloração relacionadas à necessidade de vários procedimentos (baterias), uma vez que todas as lâminas podem ser coradas através de um único procedimento, o que implica ainda, por seu turno em uma redução do custo devido à necessidade de menores volumes de reagentes, incluindo anticorpos monoclonais.

No que diz respeito à utilização de análise digital de imagens, trata-se de uma questão mais complexa de ser avaliada. Considerando-se que o procedimento padrão para quantificação da coloração restringia-se à avaliação puramente subjetiva visual, inexistia uma referência estritamente objetiva capaz de determinar a eficiência e confiabilidade dos métodos de medida digital amplamente utilizados ao longo dos últimos anos. Esta dificuldade é ainda agravada pelo fato de que estes últimos também incluem um importante componente subjetivo como a determinação de campos e a definição do espectro colorimétrico a ser empregado. Mesmo considerando estas ressalvas, nossa experiência com a análise digital neste trabalho mostrou-se aparentemente confiável e coerente com os resultados obtidos, confirmando os relatos favoráveis de Rieux *et al* (2002), Carai *et al* (2002) e Diaz *et al* (2004).

Assim sendo, embora seja bastante evidente a importância da angiogênese e seu principal fator promotor, a proteína VEGF, para o estudo da biologia e prognóstico

tumorais, torna-se necessário resolver questões que não estão claras, como aquelas evidenciadas acima. É também fundamental continuar a busca por outros parâmetros que poderão ajudar na identificação de pacientes que tenham necessidade de tratamento adjuvante, possibilitando aumentar sua sobrevida e elevar as suas chances de cura.

CONCLUSÃO

Não foi possível confirmar a hipótese de que os níveis de expressão imunohistoquímica da proteína VEGF nos carcinomas colorretais são superiores nos tumores com presença de metástase em linfonodos regionais, utilizando uma Matriz de Amostras Teciduais e análise de imagens assistida por computador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.

ALTOMARE, D. F. *et al.* Tissue factor and vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer: relation with cancer recurrence. **Colorectal Dis**, 9(2):133-138, 2007.

BATIFFORA, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. **Lab. Invest**, 55:244-248, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

CARAI, A. *et al.* Computerized quantitative color analysis for histological study of pulmonary fibrosis. **Anticancer Res**, 22(6C):3889-3894, 2002.

CASCINU, S. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. **Clinical Cancer Research**, 6:2803-2807, 2000.

CATENA, R. *et al.* Increased expression of VEGF₁₂₁/VEGF₁₆₅₋₁₈₉ ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. **Int. J. Cancer**, 120:2096-2109, 2007.

DEVITA, V. T.; Helman, S.; Rosemberg, S. A. **Cancer: Principles e Pratices os Oncology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

DIAZ, L. K. *et al.* Interobserver agreement for estrogen receptor immunohistochemical analysis um breast cancer: s comparasion of manual and computer-assisted scoring methods. **Ann Diagn Pathol**, 8(1):23-27, 2004.

DIAZ-RUBIO, E. Vascular endothelial growth factor inhibitors in colon cancer. **Adv Exp Med Biol**, 587:251-275, 2006.

DOGER, F. K. *et al.* Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer?. **Eur Surg Res**, 38(6):540-544, 2006.

ELLIS, L. M. *et al.* Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. **The Oncologist**, 5(1):11-15, 2000.

ERGUÍLUZ, C. *et al.* Multitissue array review: A chronological description of tissue array techniques, applications and procedures. **Pathology - Research and Practice**, 202:561-568, 2006.

FEARON, E. R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61:759-767, 1990.

FENOGLIO-PREISER, C. M. *et al.* **Gastrointestinal Pathology an Atlas and Text**. 2 ed, New York: Lippincott-Raven, 1998.

FERRARA, N. *et al.* Discovery and development of bevacizumab, an anti VEGF antibody for treating cancer. *Nature Rev Cancer* 3:391-400, 2004.

_____, N.; Gerber, H.; Le-Couter, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, 9(6):669-676, 2003.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, 267(16):10931-10934, 1992.

_____, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic implications. **N Engl J Med**, 285:1182-1186, 1971.

_____, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Jornal of The National Cancer Institute**, 82(1), 1990.

FUNAKI, H. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor-D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. **Oncology**, 64:416-422, 2003.

HE, X. W. *et al.* Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-C inhibits tumor lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer in vivo in mice. **Chin Med J (Engl)**, 121(5):439-444, 2008.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. *et al.* Evaluation of global DNA hypomethylation um human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. **Gut**, 47(5):689:693, 2000.

HOEBEN, A. *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev**, 56:549-580, 2004.

JOHANSSON, A. C. *et al.* Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high- and low-magnification images. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 49(9):1073-1079, 2001.

KAZAMA, S. *et al.* Expression pattern of vascular endothelial growth factor in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa. **Hepatogastroenterology**, 51(56):391:395, 2004.

- KEKEC, Y. *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor-A Expression in colorectal cancer. **J. Cancer Mol**, 2(4):161-167, 2006.
- KONONEN, L. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, 4:844-847, 1998.
- KRAAZ, W.; Risberg, A.; Hussein, A. Multiblock: an aid in diagnostic immunohistochemistry. **J. Clin. Pathology**, 41:1337 (Letter), 1988.
- MARKS, G. *et al.* Apoptotic effects of inositol hexaphosphate on biomarker Itpr3 in induced colon rat carcinogenesis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 23(2):157:164, 2008.
- MULKEEN, A. L. *et al.* Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. **Arch Surg**, 141(4):367-374, 2006.
- NEVES, F. J.; Koifman, R. J.; Mattos, I. E. Mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em capitais brasileiras selecionadas. **Rev Bras Epidemiol**, 9(1):112-20, 2006.
- PINHO, M. S. L. *et al.* Incidência do câncer colorretal na regional de saúde de Joinville (SC). **Rev Bras Coloproct**, 23(2):73-76, 2003.
- _____, M. S. L. A estória biomolecular do pólipó adenomatoso. **Rev Bras Coloproct**, 26(2):197-203, 2005.
- PODAR, K.; Anderson, K. C. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. **Blood**, 105(4):1383-1395, 2005.
- RIEUX, C. *et al.* Analysis of immunohistochemical label of FOS protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification. **J Biol Rhythms**, 17(2):121-136, 2002.
- ROSSI, B. M.; Pinho. M. S. L. **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. São Paulo: Lemar, 1999.
- SANNINO, P.; Shousha, S. Demonstration of estrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. **J Clin Pathol**, 47:90-92, 1994.
- SENGER, D. R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, 219:983-985, 1983.
- TAKAHASHI, Y. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and Its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. **Cancer Research**, 55(15):3964-3968, 1995.

UNDERWOOD, R. A. *et al.* Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. **J Histochem Cytochem**, 49(10):1285-1291, 2001.

VOGELSTEIN, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. **The New England Journal of Medicine**, 319(9):525-532, 1988.

WEIHRAUCH, M. R. *et al.* Complete remission in a colon cancer patient with a large, irresectable liver metastasis after XELOX/cetuximab/bevacizumab treatment. **Onkologie**, 31(8-9):464-467, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer. Fact sheet n° 297**. July 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>>. Acesso em: 5 de novembro de 2008.

YAMAZAKI, K.; Yoshino, T.; Boku, N. Bevacizumab (Avastin). **Gan To Kagaku Ryoho**, 34(8):1183-1191, 2007.

ZHENG, S. *et al.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol**, 9(6):1227-1230, 2003.