



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
E SAÚDE PÚBLICA**

**ELIANE DUARTE MOTA**

---

**Potencial prognóstico da expressão de COX-2 e VEGF-C no  
adenocarcinoma colorretal de pacientes de um Hospital de referência do  
SUS no tratamento oncológico.**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi.

**Goiânia  
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL

**ELIANE DUARTE MOTA**

---

**Potencial prognóstico da expressão de COX-2 e VEGF-C no  
adenocarcinoma colorretal de pacientes de um Hospital de referência  
do SUS no tratamento oncológico.**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi.

**Dissertação de Mestrado submetida ao  
PPGMT/UFG como requisito parcial para  
obtenção do Grau de Mestre em Medicina  
Tropical e Saúde Pública, na área de  
concentração em Doenças Infecto-  
Parasitárias.**

**Goiânia  
2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
UFG**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

M917p Mota, Eliane Duarte.  
Potencial prognóstico da expressão de COX-2 e VEGF-C no adenocarcinoma colorretal de pacientes de um Hospital de referência do SUS no tratamento oncológico [manuscrito] / Eliane Duarte Mota. - 2012.  
xv, 75 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis;  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2012.  
Bibliografia.  
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.  
Apêndices.

1. Adenocarcinoma colorretal – Goiás (Estado). 2. Câncer – Metástase – Estudo. I. Título.

CDU:616.33-006.6(817.3)

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde  
Pública  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**Aluna: ELIANE DUARTE MOTA**

---

**Orientadora: PROF. DRA. ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS**

---

**Co-orientadora: PROF. DRA. VERA APARECIDA SADDI**

---

**Membros:**

**1. PROF. DRA. ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS**

**2. Prof. Dr. JOÃO ALVES DE ARAÚJO FILHO**

**3. Prof. Dr. ELISMAURO FRANCISCO DE MENDONÇA**

**Data: 23/03/2012**

*A Deus, sem O qual absolutamente nada seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, que nos amou primeiro.

À minha família, em especial à minha querida filha Eduarda, à minha querida mãe Maria Helena, ao meu pai Ercílio Ferreira da Mota (em memória), ao irmão Luiz Carlos da Mota Neto e cunhada Aleida Ferreira de Siqueira pelos ótimos momentos de convivência, aos sobrinhos João Victor Pinto Silva Mota e Luiza Siqueira Mota e aos primos Marlene Evangelista Mota, Tomás e Carmem Lúcia Mota pelos momentos felizes e pelo suporte em momentos importantes de minha vida. À querida Divina dos Anjos Dias pela convivência diária e pela ajuda nas tarefas da casa.

Às Profas. Dras. Ana Paula Junqueira Kipnis e Vera Aparecida Saddi, exemplos de dedicação e competência, pelas suas generosidades pessoais e científicas na orientação das etapas deste estudo e pelo trabalho incansável e rigoroso de verdadeiras mestras e cientistas que são.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. André Kipnis pela inestimável ajuda, revisando a estatística do trabalho, com contribuições imprescindíveis.

Aos amigos Rosane Silva Carneiro de Araújo e João Alves de Araújo Filho pela amizade, colaboração no projeto de pesquisa, pelos momentos de conversação edificante e pelo refúgio em sua casa.

À amiga Rita de Cássia Gonçalves de Alencar, amiga e orientadora pessoal com impressionante coragem e lucidez frente à vida, à Valéria Valdez Gomes, Karla Fabiane Soares Andrade Fernandes, Ailton Cabral Fraga Jr, cujos convívios tem sido uma constante fonte de estímulo profissional, pessoal e de alegria.

Aos amigos médicos patologistas do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, ao chefe, e sempre professor Dr. Élbio Cândido de Paula, Dra. Rita Gonçalves de Alencar, querida Dra. Glória Jabur Bittar Oton (fonte de inspiração), Dr. Ailton Cabral Fraga Jr, Dra. Luciana Ximenes Salustiano e Dr. Henrique Moura de Paula e à querida Dra. Yara Rocha Ximenes (laboratório CAPC), cujo convívio tem acrescentado sabedoria e conhecimento profissional em minha vida.

Aos amigos biomédicos, farmacêuticos, técnicos e pessoal administrativo do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge: à Thelma, profissional exemplar e incansável que realizou a busca de prontuários e inúmeros serviços aleatórios, à amiga Eliana e Eterno, que cortaram com perfeição as lâminas do estudo, Karla, Rosana e Gustavo, que realizaram excelentes reações imuno-histoquímicas, Arthur e Abadio que me ajudaram com o levantamento bibliográfico, Neomézia, Rafael, Elton, Joelma, Suelen, Kátia, Benedito, Alexandre, Vitório, Daniel, Cláudia, Luciana, Elaine, Admilson, Joaquim Pimenta (amigos queridos e

profissionais dedicados) e Marilene, a quem sou muito grata por tornar menos árduos os dias de trabalho pela sua disposição constante, além da pesquisa dos blocos do estudo.

Ao colega e amigo Adriano Augusto Peclat de Paula pela generosidade e paciência em ajudar com a estatística.

Aos colegas do Serviço de Aparelho Digestivo do Hospital Araújo Jorge, cirurgiões de qualidade e profissionais incansáveis no atendimento aos pacientes, Dr. Orlando Milhomem da Mota, Paulo Moacir O. Campoli, Jales Benevides Santana, Paulo Adriano de Queiroz Barreto, Alexandre Menezes de Brito, Daniela Medeiros Milhomem Cardoso e Alan Kagan.

Aos colegas o Instituto de Ensino e Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, pela disponibilização de muitos artigos utilizados neste estudo.

Ao biólogo e Mestre Prof. Edésio Martins pela disposição e eficiência.

A José Clementino de Oliveira Neto e Kariny Vieira Soares, por toda ajuda, eficiência, simpatia e dedicação ao IPTSP.

Aos Professores da banca de qualificação, Dr. Joaquim Caetano de Almeida Netto, Dra. Vera Aparecida Saddi e Dr. João Alves de Araújo Filho, cujas observações e críticas muito contribuíram para o resultado final desta Dissertação. .

Ao Prof. Dr. Ruy Lino pelos ensinamentos em como fazer apresentações em seus seminários no IPTESP.

A Prof. Lee Chen Chen por sua paciência e gentileza em suas aulas de estatística.

A toda a equipe do laboratório de Imunopatologia da Prof. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis e demais colegas que participaram comigo de seminários e aulas: Bruna Daniella, Abadio, Adeliane, Adriano, AlexAline, Amanda, Camila, Danilo, Duanne, Fabiana, Fábio, Marcos, Monalisa e Michelle.

A todos os colegas da Central de Citopatologia do Distrito Federal, em especial a Maria De Felipe, Tânia Wanderley, Maria Nicélia, Cynthia, Cristina Kapeny, Neide e Secundina, pelo apoio.

Aos colegas do Núcleo de Anatomia Patológica do Hospital Regional de Taguatinga do Distrito Federal, Fabiana, Melissa, Mirella, Jefferson, Aline, Tiago e Juliana, pelo apoio e aos colegas técnicos e administrativos Janildes, Valdir, Manoel, Silvio, Henrique e Flávia.

---

---

## ÍNDICE

---

---

Lista de Figuras, Tabelas e Quadros.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
1.1 Adenocarcinoma colorretal.....	1
1.1.2 Carcinogênese colorretal.....	3
1.1.3 Aspectos macroscópicos e histopatológicos do adenocarcinoma colorretal..	4
1.1.4 Estadiamento do adenocarcinoma colorretal.....	10
1.1.5 Tratamento do adenocarcinoma colorretal.....	14
1.1.6 Prognóstico do adenocarcinoma colorretal.....	15
1.2 VEGF-C, angiogênese e linfangiogênese.....	17
1.3 COX-2.....	19
1.3.1 COX-2 e tumorigênese.....	22
1.3.2 COX-2, angio-linfangiogênese e metástases.....	24
1.4 Terapias alvo anti VEGF-C e anti COX-2.....	25
2. Justificativa.....	28
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. Materiais e métodos.....	31
4.1 Sujeitos da pesquisa.....	31
4.2 Descrição das amostras, escolha dos blocos de tumor e análise das lâminas.....	32
4.3 Análise imuno-histoquímica.....	36
4.4 Análise estatística.....	36
5. Resultados.....	37
5.1 Características do grupo de estudo.....	37
5.2 Avaliação da sobrevida global dos pacientes do estudo.....	38
5.3 Análise imuno-histoquímica da expressão de COX-2 nos adenocarcinomas colorretais.....	40
5.4 Análise imuno-histoquímica da expressão de VEGF-C nos adenocarcinomas colorretais.....	42

5.5 Resultados da análise histológica das reações imuno-histoquímicas para VEGF-C.....	42
5.6 Associações investigadas entre a expressão de COX-2 com aspectos clínicos, histopatológicos e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.....	44
5.7 Associações investigadas entre a expressão de VEGF-C com aspectos clínicos, histopatológicos e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.....	46
5.8 Associações investigadas entre a expressão de VEGF-C e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.....	49
6. Discussão.....	52
7. Conclusão.....	56
Referências.....	58

## **LISTA DE QUADROS, FIGURAS, TABELAS E ANEXOS**

---

QUADRO 1. Critérios para a graduação histológica dos carcinomas colorretais	08
QUADRO 2. Classificação do estadiamento TNM de carcinomas de cólon e reto	12
QUADRO 3. Grupos de estadiamento clínico dos carcinomas colorretais segundo o Sistema TNM de classificação dos Tumores Malignos	13
QUADRO 4. Correlação observada com os anticorpos analisados, segundo autores	27
FIGURA 1. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal de paciente do estudo	06
FIGURA 2. Fotomicrografia mostrando área de adenocarcinoma colorretal e área normal	09
FIGURA 3. Esquema baseado nas ações fisiológicas da ciclooxigenase 1 e 2	21
FIGURA 4. Curva de Sobrevida global de pacientes com adenocarcinoma colorretal	38
FIGURA 5. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal positivo para COX-2	40
FIGURA 6. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal negativo para COX-2	41
FIGURA 7. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal positivo para VEGF-C	43
FIGURA 8. Associação da expressão de VEGF-C em adenocarcinomas colorretais, segundo Soumaoro et al., 2006	50
FIGURA 9. Associação da expressão de VEGF-C, segundo Agaki et al., em adenocarcinomas colorretais	17
TABELA 1. Possíveis associações avaliadas entre os aspectos clínicos e a sobrevida de pacientes com carcinomas colorretais	39
TABELA 2. Possíveis associações avaliadas entre a expressão de COX-2 e os aspectos clínicos e histopatológicos dos adenocarcinomas colorretais do grupo de estudo	45
TABELA 3. Possíveis associações avaliadas entre os aspectos clínicos e a expressão de VEGF-C em pacientes com carcinomas colorretais, segundo o método de avaliação de Soumaoro et al	46
TABELA 4. Possíveis associações avaliadas entre os aspectos clínicos e histopatológicos e a expressão de VEGF-C em pacientes com carcinomas	48

colorretais, segundo o método de avaliação de Agaki et al.

FIGURA 8. Distribuição dos pacientes quanto ao estadiamento em à sobrevida em 5anos	50
FIGURA 9. (Associação da expressão de VEGF-C, segundo Agaki et al, 2000, com a sobrevida global em cinco anos	51
ANEXO 1. (Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao câncer em Goiás	68
ANEXO 2. Relação dos dados coletados	69
ANEXO 3. Planilha de quantificação das reações imuno-histoquímicas	70
ANEXO 4. Carta de recebimento da submissão do artigo pela revista	74
ANEXO 5. Artigo submetido à revista <i>The Journal of Surgical Research</i>	75

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
AINH	Anti-inflamatório não hormonal
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i> (do inglês, Adenomatose Polipoide Colônica)
CDC	<i>Centre of Diseases Control</i> (do inglês Centro de Controle de Doenças)
Cm	Centímetros
COX-2	Ciclooxigenase 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i> (do inglês Polipose adenomatosa familiar)
5-FU	5-Fluouracil)
HAJ	Hospital Araújo Jorge
HE	Hematoxilina-eosina
HNPCC	<i>Hereditary Non Polyposis colorectal cancer</i> (do inglês Câncer colorretal hereditário sem polipose familiar)
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i> (do inglês, Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kras	<i>Kirsten retrovirus-associated DNA sequences</i> (do inglês Sequências de DNA associadas a retrovírus Kirsten)
LV	Leucovorin
MAB	<i>Monoclonal antibody</i> (do inglês, anticorpo monoclonal)
MLH1	<i>MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2(E.Coli)</i> (do inglês MutL homólogo 1 de câncer de cólon tipo não-polipose 2, <i>E.Coli</i> )
MSH2	<i>MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)</i> (do inglês MutS homólogo 2 de câncer colorretal tipo não-polipose 1, <i>E.Coli</i> )
MSI	<i>Microssatellit Instability</i> (do inglês Instabilidade de microssatélites)
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
p53	Proteína p53
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences software</i> (do inglês, Programa de Pacote Estatístico para Ciências Sociais)
SUS	Sistema Único de Saúde
TAM-1	<i>Tumour-associated macrophages</i> (do inglês, Macrófagos Associados a Tumor)
TNF- $\alpha$	<i>Tumour Necrosis Factor- <math>\alpha</math></i> (do inglês Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ )
TNM	<i>Tumour-Node-Metastasis</i> (do inglês, tumor-linfonodo-metástase)
VEGF-C	<i>Vascular Endothelial Growth Factor C</i> (do inglês, Fator

VEGF-A	de Crescimento Endotelial Vascular C) <i>Vascular Endothelium Growth Factor-A</i> (do inglês, Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular A)
VEGFR	<i>Vascular Endothelium Growth Factor Receptor</i> (do inglês, Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
VEGF-D	<i>Vascular Endothelium Growth Factor-D</i> (do inglês, Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular D)
WHO	<i>World Health Organization</i> (do inglês Organização Mundial da Saúde)

## RESUMO

---

**INTRODUÇÃO:** O adenocarcinoma colorretal (ACC) é uma doença de distribuição mundial e a metástase para linfonodos regionais está associada com pior prognóstico. A angiogênese e a linfangiogênese estão relacionadas com metástases. O Fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C) e a Ciclooxygenase 2 (COX-2) são moléculas diretamente envolvidas nestes processos. Investigamos a possível associação da expressão de VEGF-C e COX-2 com características clínico/patológicas e a sobrevida em cinco anos.

**MÉTODOS:** Cento e trinta e quatro casos de adenocarcinoma colorretal foram selecionados randomicamente. A expressão de COX-2 e VEGF-C foi detectada por imuno-histoquímica e as possíveis associações com aspectos clínicos e patológicos investigados.

**RESULTADOS:** A expressão de COX-2 foi positiva em 133 (98,67%) pacientes e a expressão de VEGF-C foi encontrada em 73 (54,48%) pacientes. Não foram observadas associações significativas entre a expressão de COX-2 e metástases para linfonodos, invasão tumoral e nem com a sobrevida global em cinco anos. Quando a avaliação da expressão de VEGF-C foi realizada segundo Soumaoro et al, 2006, não associação com os aspectos estudados ( $p > 0,05$ ) e quando a expressão foi avaliada segundo Agaki et al., 2000, houve associação com metástases para linfonodos regionais o grau histológico do tumor ( $p = 0,01$ ) e com o estadiamento clínico ( $p = 0,005$ ).

**CONCLUSÃO:** A maioria dos casos de ACR foram positivos para COX-2. Foram observadas associações entre a expressão de VEGF-C e metástases para linfonodos, bem como com os estadios clínicos da doença, embora, não tenha sido encontrada associação com a sobrevida em cinco anos.

Palavras-chave: colorretal, câncer, VEGF-C, COX-2, tumor.

## ABSTRACT

---

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Colorectal adenocarcinoma (CRA) is a worldwide distributed pathology, and lymph node metastasis is associated with a poor prognostic outcome. Angiogenesis and lymphangiogenesis are correlated with metastasis. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and Cyclooxygenase 2 (COX-2) are molecules directly involved in those processes. We investigated the possible association of the expression of VEGF-C and COX-2 with clinical/pathology features and five year survival rate.

**MATERIALS AND METHODS:** One hundred and thirty four cases of CRA from a Cancer Reference Hospital were randomly selected. The expression of VEGF-C and COX-2 was detected by immunohistochemistry and a univariate analysis was applied to evaluate the association between their expression and clinical stages, metastasis, and/or survival.

**RESULTS:** COX-2 expression was observed in 98.67% of the adenocarcinoma cases while VEGF-C was found in 54.48% of the cases. COX-2 was highly expressed by all clinical stages of CRA, but its expression was not associated with LN metastasis, tumor infiltration or five years survival. A correlation was observed between LN metastasis and VEGF-C positivity ( $p=0.02$ ) and clinical stages of the disease. The range of VEGF-C expressions was from 34.6% to 88.9% in stages 1 through 4, respectively.

**CONCLUSION:** The majority of the CRA cases were positive for COX-2. It was observed association between the expression of VEGF-C and LN metastasis as well as with clinical stages of the disease, although no association was found to the overall five year survival rate.

Key words: colorectal, cancer, VEGF-C, COX-2, adenocarcinoma, tumor.

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Adenocarcinoma colorretal

O adenocarcinoma de cólon e reto (colorretal) é uma neoplasia maligna epitelial com origem no intestino grosso, principalmente no sigmoide e reto, sendo um dos tumores malignos mais comuns nos países ocidentais, contribuindo com 11% dos óbitos por câncer independente dos gêneros, com 56.000 óbitos/ano (Jemal et al. 2003; Robbins & Cotra, 2008; WHO 2010). A maioria destes carcinomas ocorre esporadicamente, sem síndromes genéticas ou familiares de base (Robbins & Cotran 2008). É uma neoplasia maligna de distribuição mundial, com altas taxas de óbito (cerca de 10% de todos os óbitos relacionados ao câncer nos Estados Unidos). É também descrito como ocupando o quarto lugar global em neoplasias malignas em humanos, a terceira causa mais comum de morte por câncer no mundo, a segunda em prevalência nos Estados Unidos e a neoplasia maligna mais prevalente na Espanha, sem preferência de gênero (Karnes-Jr et al. 2000; Berger et al. 2003; Le Voyer 2003; Robbins & Cotran 2008; Inca 2011; Perea et al. 2011).

Segundo a publicação de 2009 do Instituto Nacional do Câncer, intitulada Incidência de Câncer no Brasil para 2010 e 2011, a incidência esperada no Brasil é de 489.210 novos casos de câncer, sendo 28.110 novos casos de câncer colorretal, ocupando o quarto lugar em incidência de neoplasias malignas no país, quando se excluem os cânceres de pele não melanomas e estima-se ainda a incidência de 640 novos casos para o Estado de Goiás (INCA 2011).

O adenocarcinoma colorretal esporádico origina-se através de múltiplas interações moleculares consecutivas, as quais alteram o genótipo e o fenótipo de uma célula normal até sua transformação em célula neoplásica

maligna (Perea et al. 2011). O modelo de sequência adenoma-carcinoma, proposto por Fearon & Vogelstein 1990, ainda é amplamente aceito como a provável sequência de eventos do desenvolvimento do câncer colorretal esporádico, a qual apresenta alterações fenotípicas identificáveis, iniciando-se por proliferação epitelial com formação de adenomas, os quais passam a apresentar alterações displásicas/atípicas (Kinzler & Vogelstein 1996; Robbins & Cotran 2008). Esta sequência já é bem fundamentada por algumas observações científicas que demonstraram que populações com alta prevalência de adenomas têm também alta prevalência de câncer colorretal (sendo que o pico de incidência dos pólipos antecede em alguns anos o pico de incidência dos carcinomas colorretais) e, principalmente, a observação de que quando há programas de acompanhamento de pacientes com adenomas, com remoção dos mesmos, há redução do carcinoma colorretal (Kinzler & Vogelstein 1996; Robbins & Cotran 2008).

A maior incidência do carcinoma colorretal ocorre entre 50 a 79 anos de idade e menos de 20% ocorrem antes dos 50 anos (Robbins & Cotran 2008; Inca 2011). A alta incidência do carcinoma colorretal é observada em países com dieta do tipo ocidental (alimentos altamente calóricos e ricos em gordura animal), combinados com um estilo de vida sedentário. Estudos mostram que dentre os fatores de risco mais importantes estão a idade (a incidência aumenta com o aumento da faixa etária) (Levin et al. 2008), a história familiar de câncer de cólon e reto, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino como as poliposes adenomatosas, a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) (Fujita et al. 2000; Luciani et al., 2007; Levin et al. 2008; Christensen et al. 2008; Inca 2011; Santos-JR 2009) e as doenças inflamatórias crônicas ou persistentes tais como a Doença de Crohn e a retocolite ulcerativa idiopática. Além disso, a obesidade, o alto consumo de carne, o tabagismo e o álcool também estão relacionados com o desenvolvimento do câncer colorretal (Santos-Jr 2009; WHO 2010). Associações inversas nas populações incluem consumo regular de frutas, grãos integrais, vegetais, cálcio e vitamina D, terapia de reposição de hormônios esteroides em mulheres e uso prolongado de antiinflamatórios

não hormonais (Santos-Jr 2009; WHO 2010; Inca 2011). A prática de atividade física regular também está associada a um baixo risco de desenvolvimento do câncer de cólon e reto (Wei 2004; Christensen et al. 2008; Santos-Jr 2009; WHO 2010; Inca 2011).

A grande maioria dos pacientes com câncer colorretal é assintomática e muitas vezes a neoplasia é diagnosticada em exames de rotina preventiva. Apesar de silenciosa em estágios iniciais, quando o volume tumoral produz sintomas, os mesmos se manifestam mais comumente por alteração do hábito intestinal, principalmente constipação (por que a massa tumoral dificulta a passagem das fezes sólidas), anemia de origem indeterminada associada a astenia (fraqueza), dor abdominal, massa abdominal, hematoquezia (fezes contendo sangue), diarreia, náuseas, vômitos e tenesmo (vontade persistente de evacuar), principalmente em tumores localizados em retossigmoide (Sheehan 1999; WHO 2010; Inca 2011).

### **1.1.2 Carcinogênese colorretal**

A sequência de eventos que ocorre desde uma célula normal da mucosa colorretal até o carcinoma pode ocorrer através de dois modelos de vias de carcinogênese, amplamente aceitas, que são a via do APC/Beta-catenina (gene da adenomatose poliposa do cólon) e a via da instabilidade de microssatélites (MSI) (Fearon & Vogelstein 1990; Hsi et al. 1999; Knudson 2001; Robbins & Cotran 2008; Perea et al. 2011). A via do gene APC, que é um gene supressor de tumor, relaciona-se a uma sequência de eventos iniciando-se com a perda ou mutação deste gene, um evento que ocorre precocemente na formação dos adenomas, os quais estão relacionados com o carcinoma colorretal, pois cerca de mais de 60% dos carcinomas colorretais apresentam inativação do APC (Fearon & Vogelstein 1990; Fodde & Clever, 2001; Jass 2007; Robbins & Cotran 2008; Perea et

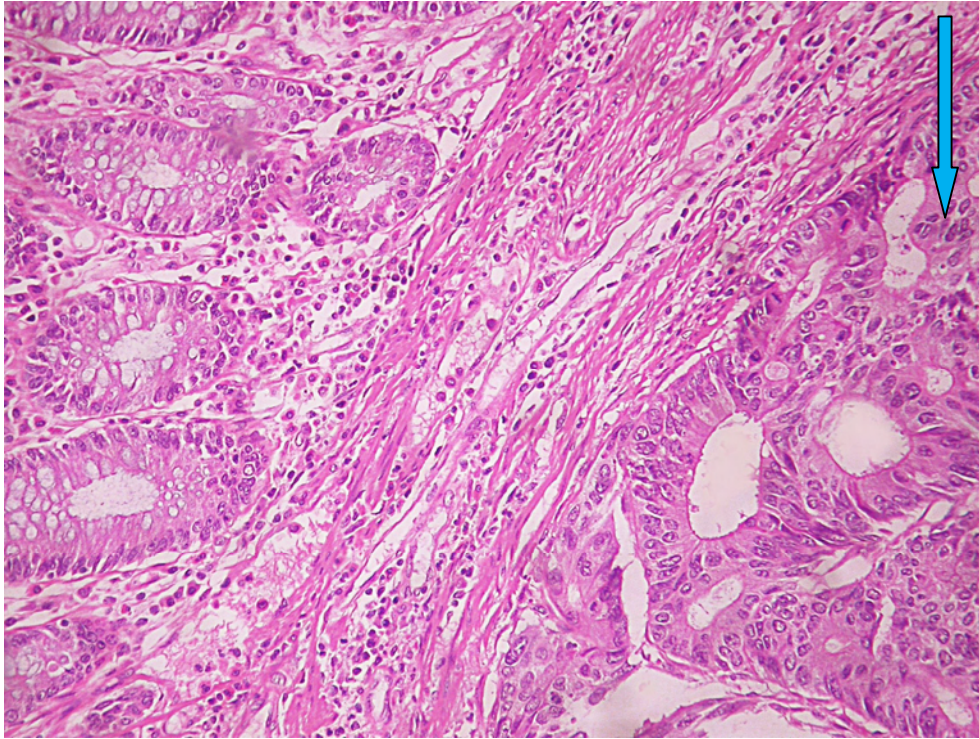
al. 2011). O evento seguinte é a mutação do Kras (o oncogene mais frequentemente presente nos adenomas e nos carcinomas do cólon), o qual desempenha um papel na transdução de sinal intracelular e está mutado em cerca de 50% dos carcinomas colorretais, seguido pela mutação do gene p53 (gene supressor de tumor ligado a 70 a 80% dos carcinomas do cólon) e ativação da telomerase (enzima de estabilidade dos telômeros, os quais são ligados à mitose e imortalização celular) como eventos subsequentes. A telomerase possui atividade aumentada em grande número dos carcinomas colorretais (Knudson & Vogelstein 2001; Robbins & Cotran 2008). A via da instabilidade de microssatélites (MSI) é caracterizada por mutações no DNA em genes de reparo de malpareamento de bases (genes que reparam quando o pareamento de bases nitrogenadas está errôneo) e está envolvida em cerca de 10% a 15% dos casos esporádicos de adenocarcinoma colorretal, a maioria das mutações envolvendo os genes MSH2 e MLH1 (Grady 2004; Robbins & Cotran 2008; Perea et al. 2011).

### **1.1.3 Aspectos macroscópicos e histopatológicos do adenocarcinoma colorretal**

De forma geral, os adenocarcinomas possuem formas diversas de apresentação macroscópica: podem ser de crescimento vegetante ou exofítico, localizando-se no lúmen do órgão (intraluminal), podem ser de crescimento endofítico, infiltrando a parede (crescimento intramural) e frequentemente associado à ulceração e podem ser também de crescimento anular, com envolvimento circunferencial da parede do órgão (frequentemente produzindo estreitamento do lúmen) e, mais raramente, com crescimento do tipo infiltrativo difuso, tipo semelhante à linite plástica observada no estômago (WHO 2010). O crescimento transmural do tumor se dá pela extensão direta através da camada muscular da mucosa

(*muscularis mucosae*), submucosa e muscular própria podendo estender-se para o tecido pericólico ou peri-retal, ou ainda para além dos mesmos, envolvendo estruturas vizinhas (WHO 2010).

O adenocarcinoma colorretal é uma neoplasia originada nas células da mucosa tipo glandular, que naturalmente reveste o intestino grosso (figura 1), as quais apresentam crescimento desordenado (sem estímulo causador identificável e sem direção), alteração da relação núcleo-citoplasmática com aumento do volume nuclear acompanhado de hipercromatismo (indicando maior atividade de síntese de DNA com maior volume de cromatina), aspecto salpicado intranuclear (refletindo a irregularidade da distribuição da cromatina intranuclear), nucléolos evidentes e carioteca irregular ou defeituosa, além da presença de variável número de mitoses típicas e atípicas (Robbins & Cotran 2008).



**Figura 1. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal de paciente do estudo.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de mucosa de intestino grosso, corada pela hematoxilina e eosina, com área de padrão neoplásico tipo adenocarcinoma. A seta azul indica a área neoplásica. Foto de paciente do estudo. Coloração HE, 200X.

A característica que atualmente define o adenocarcinoma colorretal é a presença de invasão na submucosa, pois se observou que a neoplasia com características de adenocarcinoma confinado à mucosa, quando é completamente ressecada, não possui risco de metástase. Mesmo se houver característica infiltrativa em lâmina própria (contida dentro da mucosa), o consenso de autores ocidentais atuais prefere chamá-la por neoplasia intraepitelial da mucosa de alto grau ou displasia de alto grau. Entretanto, o termo adenocarcinoma intramucoso é recomendado pela Sociedade Japonesa de Câncer do Cólon e Reto. (Stolte 2003; Soreide et al. 2009; WHO 2010). Mais de 90% dos carcinomas colorretais são adenocarcinomas, ou seja, neoplasias originadas em células epiteliais produtoras de muco ou outros fluidos (Boyle et al. 2008; Robbins & Cotran 2008; WHO 2010).

O adenocarcinoma colorretal possui variantes histopatológicas que podem significar uma alteração do prognóstico ou curso da doença, definidas a partir de suas características morfológicas à microscopia óptica, tais como: adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma medular, adenocarcinoma serrado (ou serrilhado), o adenocarcinoma cribriforme tipo comedo, o adenocarcinoma micropapilar, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células fusocelulares e o carcinoma indiferenciado. Dentre as variantes mais importantes destacamos: a) adenocarcinoma mucinoso, cujo requisito é possuir mucina/muco extracelular, podendo ter poucos grupamentos de mucina intracelular, em mais de 50% da neoplasia (WHO 2010); b) A variante adenocarcinoma tipo anel de sinete, cuja designação é dada por lembrar morfológicamente um anel com sinete, possui células neoplásicas com citoplasmas contendo abundante quantidade de mucina em mais de 50% do tumor; sua agressividade depende de sua classificação conforme a expressão de instabilidade de microssatélites, aqueles que faltam a MSI-H são usualmente muito agressivos (Pande et al. 2008); a variante de carcinoma medular, a qual é caracterizada por lençóis de células malignas com núcleos vesiculares, nucléolos proeminentes e citoplasma abundante e eosinofílico, permeadas por intenso infiltrado inflamatório linfocítico com permeação intraepitelial. O tipo medular, na maioria das vezes, apresenta

expressão de MSI-H e é de prognóstico favorável (Kirchner Reu 2008; Selves 2009). As demais variantes são raras (WHO 2010).

A graduação do adenocarcinoma colorretal é tradicionalmente baseada no percentual de formação glandular, sendo dividido em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (quadro 1).

**Quadro 1.** Critérios para a graduação histológica dos carcinomas colorretais

<b>Critério</b>	<b>Categoria de diferenciação</b>	<b>Grau numérico</b>	<b>Grau descritivo</b>
>95% com diferenciação glandular	Bem diferenciado	1	<b>Baixo</b>
41-95% com formação glandular	Moderadamente diferenciado	2	<b>Baixo</b>
>0-40% com formação glandular	Pobrememente diferenciado	3	<b>Alto</b>
Alto grau de instabilidade de microssatélites	Variável	Variável	<b>Baixo</b>
A categoria carcinoma indiferenciado (grau 4) é reservada para carcinomas sem formação glandular, sem produção de mucina nem diferenciação neuroendócrina, escamosa ou sarcomatoide.			

Fonte: Adaptação da tabela WHO, 2010.

Atualmente, o critério descritivo com os termos baixo grau e alto grau têm sido preferidos para o manejo clínico, possuindo grande reprodutibilidade. Esta graduação vale apenas para o adenocarcinoma sem outra especificação (figura 2), pois os subtipos possuem prognósticos diferentes conforme sua variante. Na graduação, o predomínio de áreas de glândulas malformadas e mal diferenciadas, têm sido classificados como alto grau e associadas com prognóstico mais agressivo (Ogawa et al. 2009; WH, 2010).

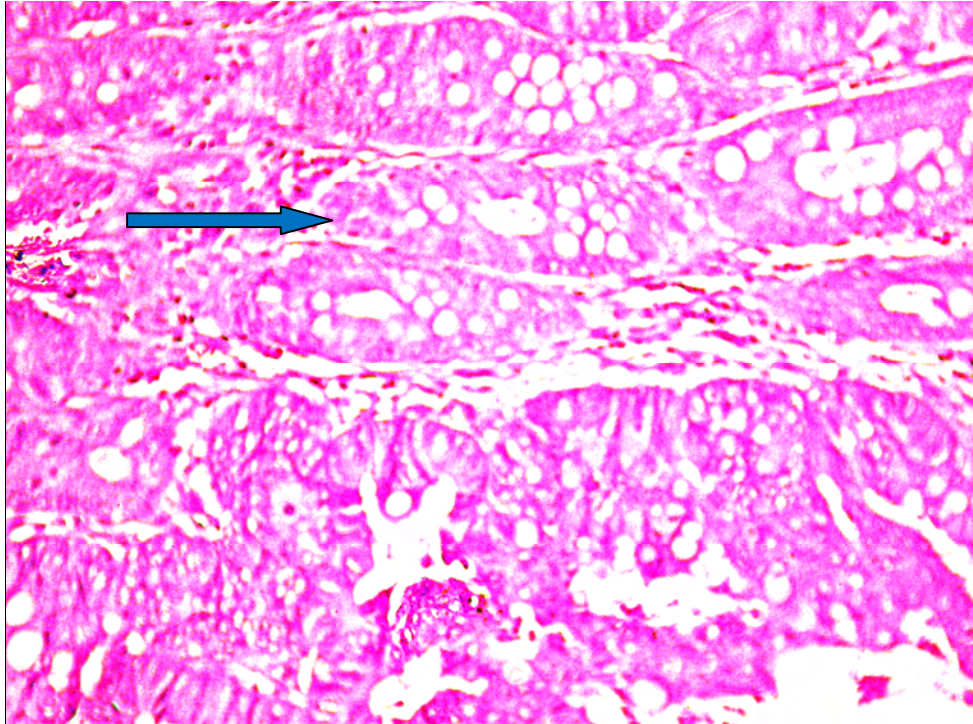


Figura 2. **Fotomicrografia mostrando área de adenocarcinoma colorretal e área normal.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de mucosa de intestino grosso corada pela hematoxilina e eosina, com área de neoplasia tipo adenocarcinoma. As glândulas normais estão indicadas pela seta azul e nota-se a diferença com as glândulas neoplásicas do adenocarcinoma abaixo. Foto de lâmina de paciente do estudo, coloração HE, aumento 200x.

#### 1.1.4 Estadiamento do adenocarcinoma colorretal

O estadiamento do carcinoma colorretal pode ser clínico ou histopatológico e é de suma importância, uma vez que o estágio da doença no momento do diagnóstico é um forte fator de prognóstico de sobrevivência. No adenocarcinoma colorretal, o fator isolado mais importante na predição do prognóstico é o estado de comprometimento dos linfonodos regionais retirados na peça cirúrgica, além disso, a extensão da invasão na parede do órgão também é outro dos fatores (Sheehan 1999; Leslie et al. 2002; WHO 2010). A quantidade dos linfonodos retirados varia bastante, podendo ser devido a modificações necessárias na técnica cirúrgica, na variação individual do número de linfonodos ou até mesmo na dificuldade do patologista em encontrá-los nos espécimes cirúrgicos retirados. Segundo autores, a sobrevivência global em cinco anos de pacientes em estágio I e II com invasão inicial da parede é de cerca de 75%, porém, quando há comprometimento de linfonodos, a sobrevivência diminui para 30 a 60%, demonstrando que a presença de metástases representa um fator importante de prognóstico para os pacientes (Le Voyer et al. 2003).

Tendo como base a classificação proposta por Cuthbert Dukes em 1929-1935, o sistema *Tumour-Node-Metastasis* (TNM), de estadiamento do câncer colorretal (quadro 2) é o mais utilizado, graças à sua grande utilidade e padronização. Conforme apresentado nos quadros 2 e 3, a classificação designa T para representar a profundidade de invasão do tumor na parede do órgão, N designa o comprometimento dos linfonodos e M a presença de metástases à distância. O estadiamento I (T1 a T2, N0, M0) define um tumor que invade apenas a submucosa (T1) ou a muscular própria (T2), sem comprometimento de linfonodos regionais. Os tumores que invadem além da camada muscular própria da parede (T3), os que infiltram o peritônio visceral (T4a) ou invadem diretamente outros órgãos ou estruturas (T4b). O estadiamento II é subdividido em estadiamento IIA (T3, N0, M0), estadiamento IIB (T4a, N0,

M0) ou IIC (T4b,N0,M0). O envolvimento de linfonodos regionais, sem metástase à distância é designado como estadio III.

Quanto ao comprometimento dos linfonodos, são divididas três categorias, sendo que N0 designa a ausência de acometimento linfático, N1 designa o acometimento de 1 a 3 linfonodos (N1a: um linfonodo envolvido, N1b: 2 a 3 linfonodos regionais e N1c para depósitos tumorais no tecido adiposo pericólico ou perirretal sem evidência histológica de linfonodo residual no nódulo) e N2 indica o acometimento de 4 ou mais linfonodos (N2a: 4 a 6 e N2b: 7 ou mais linfonodos acometidos). O estadio IIIA é constituído por tumores T1 ou T2, N1, M0 ou por T1, N2a, M0; já o estadio IIIB engloba tumores T3, T4a, N1, M0 ou T2, T3, N2a, M0 ou T1, T2, N2b, M0. Do estadio IIIC fazem parte os tumores T4a, N2a, M0 ou T3,T4a, N2b, M0 ou ainda os tumores T4b, N1, N2, M0. A detecção de metástases à distância define o estadio IV. M1a refere-se a metástases confinadas a um órgão (fígado, pulmão ou outros), enquanto M1b implica metástases em mais do que um órgão ou no peritoneu. O estadio IV engloba os estadios IV A (qualquer T, qualquer N, M1a) e o estadio IV B (qualquer T, qualquer N, M1b) (*AJCC Cancer Staging Manual 2009; TNM classification of malignant tumours 2010; WHO 2010*), (Quadros 2 e 3).

O risco de metástases à distância e para linfonodos regionais aumenta proporcionalmente ao aumento do T, ou seja, da profundidade da invasão (Wolpin et al. 2008).

Quadro 2. Estadiamento TNM de carcinomas colorretais baseado no Sistema TNM de classificação dos Tumores Malignos.

T – Tumor primário	
TX	Tumor primário não pode ser acessado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade subserosa ou tecidos pericólicos ou peri-retais não peritonizados
T4	Tumor invade o peritônio visceral e/ou invade diretamente outros órgãos ou estruturas
T4a	Tumor invade o peritônio visceral
T4b	Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas
N – Linfonodos regionais	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N1a	Metástase em 1 linfonodo regional
N1b	Metástases em 2 a 3 linfonodos regionais
N1c	Depósito(s) tumoral(is), ou seja, acúmulos tumorais satélites na subserosa ou em tecidos pericólicos ou peri-retais não peritonizados sem metástases em linfonodos regionais
N2	Metástases em 4 ou mais linfonodos regionais
N2a	Metástases em 4 a 6 linfonodos regionais
N2b	Metástases em 7 ou mais linfonodos regionais
M – Metástases à distância	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Metástase confinada a um único órgão
M1b	Metástases em mais de um órgão ou em peritônio

Fonte: [Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos](#), adaptação WHO, 2010.

(Adaptado de: Sobin LH. Gospodarowicz. Wittekind C. Colon and rectum. In: TNM Classification of Malignant tumours. 7 th edition. Blackwell publishing; 2010. p. 100-105).

Quadro 3. Grupos de estadiamento clínico dos carcinomas colorretais segundo o Sistema TNM de classificação dos Tumores Malignos.

Estadiamento clínico			
Estágio	T	N	M
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1, T2	N0	M0
Estágio II	T3, T4	N0	M0
Estágio IIA	T3	N0	M0
Estágio IIB	T4a	N0	M0
Estágio IIC	T4b	N0	M0
Estágio III	Qualquer T	N1, N2	M0
Estágio IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Estágio IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Estágio IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Estágio IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estágio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Fonte: [Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos](#), adaptação WHO, 2010.

(Adaptado de: Sobin LH. Gospodarowicz. Wittekind C. Colon and rectum. In: TNM Classification of Malignant tumours. 7 th edition. Blackwell publishing; 2010. p. 100-105).

### 1.1.5 Tratamento do adenocarcinoma colorretal

O tratamento cirúrgico permanece como a principal opção potencialmente curativa para o câncer colorretal, associado ou não aos tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos adjuvantes (realizados após o tratamento cirúrgico) ou neo-adjuvantes (realizados antes do tratamento cirúrgico). As técnicas operatórias atualmente mais utilizadas no câncer colorretal esporádico são as hemicolectomias, colectomia total, retossigmoidectomia ou a amputação abdominoperineal (retirada do reto e canal anal). A prioridade no tratamento cirúrgico é a ressecção oncológica, com margens cirúrgicas livres e adequadas, a excisão em bloco do mesorreto (quando indicada) e a retirada dos linfonodos de drenagem (Leslie et al. 2002; Le Voyer et al. 2003; Berger et al. 2003; Van der Voort van Zijp et al. 2008; Santos-Jr 2009).

Nos casos de carcinoma colorretal com metástases hepáticas ou pulmonares ressecáveis, deve-se tentar a retirada do tumor com margem cirúrgica, a fim de obter uma sobrevida em cinco anos de 25 a 30%. Nos casos de metástases hepáticas irressecáveis, a ablação por radiofrequência é uma alternativa terapêutica (Leslie et al. 2002; Le Voyer et al. 2003; Berger et al. 2003; Van der Voort van Zijp et al. 2008; Santos-Jr 2009)

Segundo o projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira em Conjunto com o Conselho Federal de Medicina, 2001, o tratamento adjuvante do câncer colorretal tem indicação para pacientes com estadios III. A maioria dos doentes com doença metastática são candidatos à quimioterapia para alívio dos sintomas e prolongamento da sobrevida, obtendo uma diminuição da mortalidade para cerca de 33%. A terapia recomendada utiliza principalmente o 5-Fluoracil (5-FU), um inibidor da sintetase do timidilato, associado ao Leucovorin (LV), que aumenta a afinidade do 5-FU ao seu alvo terapêutico (Wolpin et al. 2007; Wolpin et al. 2008; Van der Voort van Zijp J et al. 2008). Os esquemas recomendados pelo Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira são: 5-

FU/Leucovorin durante 6 meses ou 5-FU/Leucovorin em altas doses semanais durante 6 meses ou 5-FU/Levamisole durante 1 ano. O Projeto Diretrizes ainda refere que estudos indicam que o tratamento adjuvante para pacientes com estadio II podem promover uma redução do risco de recidiva com uma vantagem de 2% em sobrevida livre de doença em 5 anos para os pacientes tratados com 5-FU, quando são comparados com grupos controle sem tratamento (Wolmark et al. 1999). Outros agentes terapêuticos também podem ser utilizados, tais como a Oxiplatina, um análogo da platina, que leva a uma replicação anômala do DNA e à apoptose celular, sendo utilizada em combinação com o 5-FU e LV e o Irinotecan, que é um inibidor da topoisomerase, utilizado como segunda linha de tratamento na doença metastática. Atualmente, o esquema chamado Folfox (associação de 5-FU, LV e Oxiplatina) tem sido recomendado na terapêutica do estágio III e IV (Kosmider & Lipton 2007, Wolpin et al. 2008).

O tratamento neoadjuvante com radioterapia para os carcinomas do reto, em combinação com a quimioterapia, tem demonstrado melhorar a taxa de recorrência e também o intervalo livre de doença (Kapiteijn et al 2001; Wolpin et al. 2007; Van der Voort et al. 2008).

### **1.1.6 Prognóstico do adenocarcinoma colorretal**

A presença de metástases para linfonodos é um fator prognóstico reconhecidamente importante, demonstrando que a sobrevida em cinco anos em pacientes com adenocarcinoma colorretal com linfonodos positivos para metástases é pior do que naqueles sem metástases linfonodais (Dukes & Bussey 1958; Newland et al. 1981; Chapuis et al. 1985; Fielding et al. 1986; Agaki et al. 2000; WHO 2010).

Segundo estudos, a partir de diâmetros tumorais que variam de 1 a 3 mm<sup>3</sup>, a sobrevivência tumoral depende grandemente da neoangiogênese (desenvolvimento de novos vasos sanguíneos). A neoangiogênese é

dependente da produção de citocinas, que não apenas desenvolvem os vasos no interior do tumor, necessários para sua nutrição, mas que também estão relacionados com o processo de metástase, (George et al. 2001; Nakamoto et al. 2007; Inda et al. 2009).

Embora o adenocarcinoma colorretal seja uma causa comum de morte em todo o mundo, a sobrevida para este tipo de neoplasia é considerada boa, porém isso ocorre somente se a doença for diagnosticada em estágio inicial, sendo que a sobrevida média global em cinco anos varia entre 40% e 50%, não sendo observadas grandes diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esse bom prognóstico relativo faz com que o adenocarcinoma colorretal seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas com essa neoplasia (Agaki et al. 2000; Inca 2011).

Por ser uma doença de evolução demorada, medidas de prevenção poderiam ser implantadas na população alvo, visando à prevenção do adenocarcinoma colorretal avançado ou invasor com a finalidade de diminuir a mortalidade por este tipo de câncer. A prevenção depende da detecção precoce de pólipos adenomatosos colorretais, os quais são lesões precursoras em grande parte dos casos (Perea et al. 2011), e também de tumores em estágios iniciais. Um método muito útil é a pesquisa de sangue oculto nas fezes associada à utilização de métodos endoscópicos. Mesmo assim, a implantação de políticas de rastreamento populacional é difícil, mesmo em países desenvolvidos e com recursos financeiros disponíveis (Inca 2011).

## **1.2 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-C), angiogênese e linfangiogênese**

A partir da década de 70 Folkman e colaboradores difundiram o nome angiogênese para nomear o processo complexo de formação de novos vasos a partir da rede pré-existente (Folkman 1971; Folkman 1972). A angiogênese é essencial para o crescimento de tumores primários e para o desenvolvimento de metástases (Nakamoto et al. 2007, Inda et al. 2009). O fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C) é um mitógeno potente para as células endoteliais vasculares e sua expressão tem sido correlacionada fortemente com a angiogênese tumoral, a linfangiogênese e as metástases para linfonodos no câncer colorretal (Nakamoto et al. 2007; Du et al. 2011).

O VEGF-C é uma glicoproteína com atividade angiogênica, mitogênica e de permeabilidade vascular em células endoteliais e é o fator angiogênico mais potente conhecido (Inda et al. 2009). Inicialmente, foi identificado como um fator estimulador do receptor de tirosina-quinase Flt4, chamado de VEGF-3, tendo sido purificado a partir de células de adenocarcinoma prostático, mas estando também presente em níveis muito baixos em outros tecidos humanos adultos, tais como coração, placenta, músculo, ovário e intestino delgado. O gene do VEGF-C está localizado no cromossomo 4q34 (identificado por Paavonen et al. em 1997) e tem um alto grau de homologia com o VEGF (Agaki et al. 2000; Inda et al. 2009).

Atualmente, muita atenção tem sido voltada para a descoberta de marcadores prognósticos biológicos utilizando-se expressão gênica (Doger et al. 2006; Pierobon et al. 2009). Vários autores demonstraram a presença de alta expressão de fatores angiogênicos em tumores humanos (Nakamoto et al. 2007; Hu et al. 2007; Inda et al. 2009; Horta et al. 2009; Du et al. 2011) e várias evidências experimentais indicam que a alta expressão dos genes de Fator de Crescimento Endotelial Vascular C (VEGF-C) e da Ciclogenase-2 (COX-2) promovem a angiogênese e a linfangiogênese.

Ambos os processos são essenciais para o crescimento e disseminação de células tumorais (George et al. 2001; Soumaoro et al. 2006). Os fatores de crescimento endotelial vasculares são mediadores chaves para a angiogênese e estão também relacionados a vários outros processos, tais como quimiotaxia de monócitos, desenvolvimento de células dendríticas e sobrevivência de células-tronco hematopoiéticas, sendo que muitos outros fatores: PlGF, VEGF, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D foram identificados como membros da família dos fatores de crescimento endoteliais vasculares (Horta et al. 2009).

Em humanos, o VEGF-C ativa os receptores VEGF-2 e VEGF-3, ambos essenciais para o processo de desenvolvimento vascular. Uma correlação entre o VEGF-C e seu receptor VEGF-3 foi observada em tumores primários com invasão linfática e metástases para linfonodos (George et al. 2001; Xu et al. 2004; Inda et al. 2009). O VEGF-C não age somente como citocina angiogênica, mas também com propriedades linfangiogênicas, atuando através de receptores de tirosina-quinases, sendo que estudos demonstraram que uma alta expressão desta proteína resulta em proliferação linfática e hiperplasia da vasculatura linfática (George et al. 2001; Inda et al. 2009). A expressão do VEGF-C mediando a proteína 1 associada a metástases (MT1) teve correlação com metástases para linfonodos e o estadiamento em carcinomas colorretais (Zhen-Yang et al. 2011).

O VEGF-C é expresso de forma heterogênea no carcinoma colorretal (George et al. 2001; Inda et al. 2009; Du et al. 2011) e sua expressão sugere um pior prognóstico, embora essa expressão não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa entre adenocarcinomas de baixo e de alto grau. Ainda assim, os fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) são frequentemente relacionados a tumores de fenótipos agressivos e de pior prognóstico, sendo que a expressão do VEGF-C e as metástases linfonodais são fatores de risco descritos. Apesar disso, a relação entre VEGF-C e sobrevivência ainda não foi suficientemente esclarecida (Doger et al. 2006; Inda et al. 2009).

Utilizando-se o método imuno-histoquímico, verificou-se que o VEGF-C encontra-se expresso em cerca de 35 a 60% dos tumores (George et al. 2001), com coloração principalmente citoplasmática. Um artigo pioneiro, publicado com 99 pacientes japoneses portadores de adenocarcinoma colorretal estudados por K Agaki et al. 2000, demonstrou uma forte associação entre a expressão do VEGF-C e metástases para linfonodos (Agaki et al. 2000; George et al. 2001).

### **1.3 Ciclooxygenase-2 (COX-2)**

As enzimas da família das ciclooxigenases (COX), COX-1 e COX-2, duas formas de COX derivadas de genes distintos, desempenham um papel-chave na conversão do ácido aracônico (AA) em prostaglandinas, as quais têm sido associadas com a carcinogênese colorretal (Sheehan et al. 1999; Dimberg et al. 1999; Hsi et al. 1999; Dempke et al. 2001; Gong et al. 2009; Ghosh et al. 2010). A Ciclooxygenase 1 (COX-1) ou prostaglandina endoperóxido-sintase-1 representa a isoforma constitutiva da COX e ambas COX-1 e COX-2 pertencem à família das mieloperoxidases, sendo que a COX-1 atua no sistema de homeostasia em vários sistemas do organismo (Dempke et al. 2001; Rizzo 2011).

O gene que codifica a COX-2 humana está localizado no cromossomo 1 (1q25.2-q25.3) e apresenta cerca de 60% de homologia com a COX-1. A COX-2 é de localização principalmente no retículo endoplasmático e no envelope nuclear. O ambiente do retículo endoplasmático favorece a dimerização/ativação da enzima e a localização nuclear propicia efeitos mitogênicos derivados de prostaglandinas (Rizzo, 2011). A Ciclooxygenase-2 é uma enzima presente em pequenas quantidades nas vesículas seminais e rins e indetectável na mucosa colônica normal, estando super-expressa em alta proporção em tumores (Sheehan 1999; Hull

et al. 2000; Dannenberg et al. 2001; Rizzo 2011), participando como uma enzima da cascata da síntese de prostaglandinas que catalisa o passo inicial da transformação do ácido aracdônico em prostanoídes/prostaglandinas responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia de células inflamatórias. A alta expressão de COX-2 tem sido descrita em diversos outros tipos de cânceres (Rizzo 2011). Em condições de normalidade, a COX-2 aumenta de forma transitória frente ao estímulo inflamatório e rapidamente volta a níveis basais após o término deste estímulo, porém a expressão persistente da COX-2 está associada a neoplasias e, em algumas delas, também relacionada com pior prognóstico, fato corroborado por estudos que demonstram a diminuição da incidência de câncer colorretal, de próstata, mama e Doença de Hodgkin em pacientes usuários crônicos de aspirina e outras drogas antiinflamatórias não hormonais (Dannenberg et al. 2001; Bernardeau-Mozer et al. 2004; Rizzo, 2011), (Figura 3).

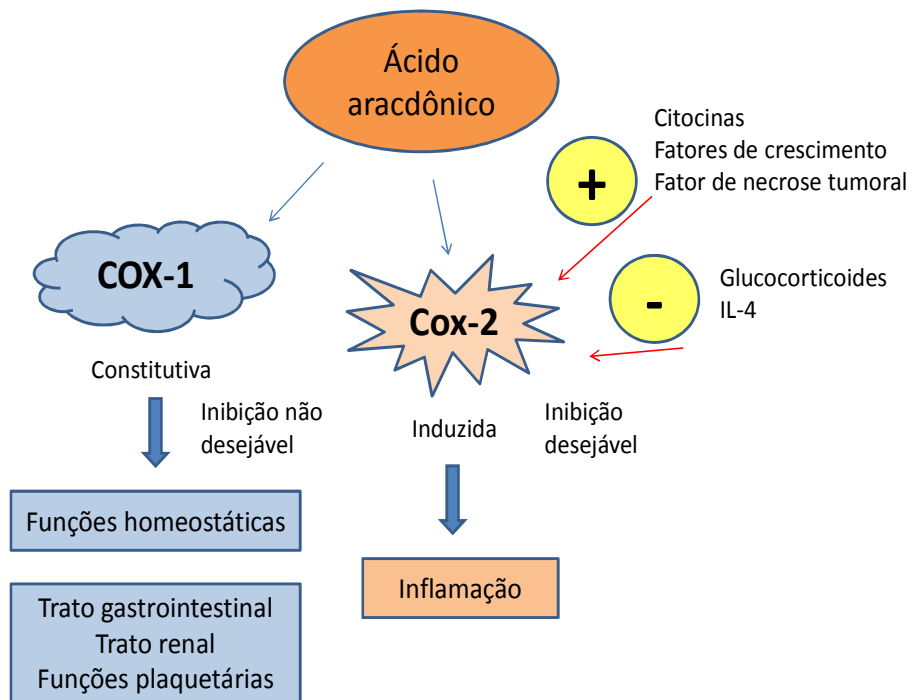


Figura 3. Esquema baseado nas ações fisiológicas da ciclooxigenase 1 e 2. Modificado a partir de <http://www.arthritis.co.za/cox.html>. Acesso em 27.08.2011

### 1.3.1 Ciclooxigenase 2 e tumorigênese

Vários trabalhos desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a COX-2 desempenha um papel-chave no processo do tipo “*multistep*” da tumorigênese colorretal, tal como a inibição da apoptose, proliferação celular, interferência imunológica inibindo a geração de linfócitos T e atividade citotóxica dos linfócitos *natural killers* (NK), além da indução da angiogênese (Gong et al. 2009; Sheehan, 1999; Fosslie, 2000; Dempke et al., 2001; Rizzo 2011; Gou et al. 2011; Brambilla et al. 2007).

Uma vez induzida por estímulos pró-inflamatórios, tais como citocinas e fatores de crescimento, e apresentando-se elevada em uma grande variedade de neoplasias, dentre elas os adenocarcinomas colorretais (Sheehan 1999; Rizzo 2011; Gou et al. 2011), o processo envolvido na tumorigênese poderia estar associado ao aumento da produção de nitrito durante os processos inflamatórios e suas interações com a COX-2. Este representaria um mecanismo importante da ativação da enzima durante o processo tumorigênico iniciado por estímulos inflamatórios duradouros. Em tumores, a localização intracelular da enzima COX-2 e sua presença também em corpos lipídicos intracitoplasmáticos são importantes na proteção contra a apoptose induzida pelo estresse oxidativo. Tal processo influencia de modo crucial o crescimento tumoral funcionando como uma fonte intracelular de contínuo abastecimento de prostaglandinas, responsáveis pela modulação de permeabilidade capilar e quimiotaxia de células inflamatórias. Além de utilizar substratos lipídicos, a COX-2 também pode metabolizar vários agentes xenobióticos como carcinógenos provenientes da dieta ou do ambiente, transformando-os através da sua atividade de peroxidase em moléculas altamente reativas, que interagem com o DNA da célula, levando à ativação de oncogenes ou à inibição de genes supressores. Os processos oncogênicos envolvendo xenobióticos parecem desempenhar um papel patogênico, especialmente em cânceres de cólon e bexiga (Dempke et al.

2001; Rizzo 2011). Quanto à inflamação, estudos indicam que a inflamação crônica é reconhecida como fator de risco para a carcinogênese epitelial e o crescimento tumoral está associado à imunossupressão. Apesar da COX-2 ser induzida pela inflamação, a mesma estimula macrófagos e monócitos a produzirem prostaglandina E2, que por sua vez inibe a produção de linfocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), enquanto promove a produção de interleucina-10 (Dannenberget al. 2001).

Essa expressão da Cicloxigenase-2 (COX-2) provavelmente desempenha um papel crucial no câncer colorretal. Estudos demonstram que inibidores seletivos de COX-2 possuem grande potencial como agentes quimio-preventivos para adenomas e câncer colorretal (Sheehan 1999; Dempke et al. 2001). Além disso, a expressão da Cicloxigenase-2 (COX-2) é um evento frequente, porém não universal no câncer colorretal (Sheehan et al. 1999; Hull et al. 2000; Hasegawa et al. 2001), variando entre tumores, e cuja extensão de coloração pelo método imuno-histoquímico provavelmente correlaciona-se com pior prognóstico (Sheehan et al. 1999; Dimberg et al. 1999). Tem sido então sugerido que a expressão da proteína COX-2 está aumentada no câncer colorretal como um defeito combinatório no sistema de reparo da célula, um fenômeno comumente associado com o câncer colorretal hereditário sem polipomatose (HNPCC), e também presente em mais de 15% dos tumores esporádicos (Dempke et al. 2001; Hasegawa et al., 2001; Castells et al. 2006).

### **1.3.2 COX-2, angio-linfangiogênese e metástases**

A Cicloxigenase-2 (COX-2) também tem sido considerada como promotora da linfangiogênese pela regulação do VEGF-C (Gou et al. 2011) e da angiogênese (Daniel et al. 1999; Dannenberg et al. 2001), dentre outras vias. Muitos estudos sugerem que o aumento da expressão da COX-2 está altamente correlacionado com a proliferação e a agressividade do tumor, a habilidade aumentada para escapar da apoptose, a neovascularização, o aumento da capacidade invasora e as metástases para linfonodos (Sheehan 1999; Fux et al. 2005; Castells et al. 2006; Rizzo 2011; Gou et al. 2011; Dannenberg et al. 2001). Ainda são pouco compreendidos os complexos mecanismos necessários para a disseminação e colonização das células tumorais a partir do sítio primário para órgãos distantes. Entretanto, sabe-se que estas células tumorais desprendidas requerem vários eventos subsequentes, caracterizados pelo aumento da capacidade de invasão de linfáticos periféricos e pela colonização e sobrevivência em sítios distantes (Rizzo 2011; Dempke et al. 2001).

Como a COX-2 influencia a tumorigênese, a mobilidade celular e os processos implicados na capacidade de invasão e metastatização, esta enzima representa um alvo molecular no manejo colorretal e seus inibidores específicos podem ser úteis tanto como quimio-preventivos como agente terapêutico em humanos (Sheehan et al. 1999; Dempke et al. 2001; Imperiale 2003; Bernardeau-Mozer et al. 2004; Rizzo 2011).

#### 1.4 Terapias alvo anti-VEGF e anti-COX-2

Nos últimos 10 anos, o tratamento oncológico de cânceres de mama, colorretal, leucemia e rim foi profundamente impactado devido ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais (*Monoclonal antibodies-MABs*) e inibidores de receptores de membrana do tipo tirosina quinase (NIBs), os quais forneceram ferramentas novas e eficazes, que mudaram as bases do tratamento oncológico destes tumores (Bross et al., 2001; Cunningham 2004; Harris et al. 2007; Escudier et al, 2008).

Recentemente, com as pesquisas no campo da patologia molecular e do desenvolvimento de terapêuticas moleculares alvo-dirigidas, os anticorpos monoclonais contra os receptores do VEGF e também do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) tem se tornado ferramentas promissoras no tratamento do carcinoma colorretal avançado (Wolpin et al. 2008). A terapêutica antiangiogênica é indicada tanto para tumores de crescimento rápido quanto para os de crescimento lento, independente do perfil de vascularização, sendo que os tumores com menor vascularização são mais suscetíveis à ação antiangiogênica.

Os anticorpos monoclonais anti-VEGF inibem a angiogênese, reduzindo a progressão tumoral e, conseqüentemente, o risco de metástases à distância. O efeito anti-angiogênico pode ser obtido através de bloqueio diretamente no VEGF, em seus receptores (VEGF-R) ou através de ambos. O Bevacizumab é um anticorpo monoclonal que se liga à molécula de VEGF e impede sua interação com seu respectivo receptor inibindo a angiogênese e foi o primeiro fármaco antiangiogênico licenciado para o adenocarcinoma colorretal avançado, sendo adicionado à quimioterapia com 5-FU/LV e irinotecan e melhorando a resposta tumoral e a sobrevida livre de doença (Hurwitz et al. 2004; Wolpin et al. 2007; Wolpin et al. 2008; Okines & Cunningham, 2009; Marquardt et al. 2009; Tol et al. 2009).

O processo inflamatório representa um possível alvo terapêutico no tratamento oncológico (Coussens & Werb 2002), sendo que muitos estudos

com pacientes usuários crônicos de aspirina (ácido acetil salicílico) evidenciaram que estes medicamentos anti-inflamatórios não-hormonais (AINH) propiciam uma proteção contra o câncer colorretal de cerca de 50%, além de uma potencial prevenção contra câncer de estômago, esôfago e pulmão por inibição da COX-2 e redução da produção de PGs, endoperóxidos e tromboxano (Baron & Sandler 2000; Madaan et al. 2000; Friis et al. 2006; Grau et al. 2009). Embora a utilização de AINH mereça ser avaliado, ainda há poucos estudos que suportem o uso concomitante de AINH no tratamento do câncer (Fu et al. 2004; Sarkar et al. 2007), embora o uso concomitante a agentes quimioterápicos ou anti-angiogênicos mereça ser avaliado.

Tanto o VEGF-C como a COX-2 tem sido implicados na tumorigênese do câncer colorretal e ainda na correlação com a piora do prognóstico nos pacientes que apresentam superexpressão destas proteínas em seus tumores. O método imuno-histoquímico tem-se mostrado útil para a avaliação da expressão destas moléculas, sendo também um método atualmente muito difundido e de custo relativamente acessível. Este método tem sido utilizado por diversos autores na tentativa de demonstrar a atuação destas moléculas em fatores prognósticos do adenocarcinoma colorretal , (Quadro 4).

Estudos demonstram associação entre a expressão do VEGF-C e metástases para linfonodos (George et al. 2001; Agaki et al. 2000), enquanto outros não identificaram o papel do VEGF-C e nem da COX-2 nos adenocarcinomas colorretais, (Fux et al. 2005; Nakamoto et al. 2007; Bambrilla et al. 2007). Entretanto, evidências científicas apontam que inibidores de VEGF-C e da COX-2 conferem benefícios clínicos no câncer colorretal metastático, quando combinados com quimioterapia, representando alvos moleculares no manejo do câncer colorretal (Sheehan et al. 1999; Dempke et al., 2001; Imperiale 2003; Bernardeau-Mozer et al. 2004; Marquardt et al. 2009; Rizzo 2011).

Quadro 4. Achados imuno-histoquímicos para COX-2 e VEGF-C em neoplasias e linfonodos.

AUTOR	ANO	N	MOLÉCULA	ANTICORPO	RESULTADO
Masunaga et al	2000	100	COX-2	Policlonal, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA.	Estadiamento, tamanho tumoral, diferenciação, metástases para linfonodos.
Zhang et al	2002	64	COX-2	Policlonal, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA.	Estadiamento.
Nakamoto	2007	44	VEGF-C/COX-2	VEGF-C polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA. Cox-2 monoclonal, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA.	Não teve correlação: idade, metástase para linfonodo, grau tumoral nem estadiamento
Soumaoro et al	2006	150	VEGF-C/COX-2	VEGF-C policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA. Cox-2 monoclonal, DakoCytomation, Glostrup, Denmark.	Correlação entre as expressões de COX-2 e VEGFC. VEGFC e COX-2 : metástase para linfonodo. COX-2 : estadiamento, tamanho do tumor e profundidade de invasão.
George et al	2001	70	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA	Invasão linfática e metástase para linfonodo
Hu et al	2007	69	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.	Metástase para linfonodo e estadiamento clínico
Onogawa	2004	139	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.	Profundidade de invasão, metástase para linfonodo e sobrevida.
Fux et al	2005	747	COX-2	Monoclonal, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA.	Não correlacionou com sobrevida.
Du et al	2011	81	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.	Correlacionou com metástase para linfonodo e estadiamento.
Doger et al	2006	60	VEGF-C	VEGF-C policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.	Correlacionou com metástase para linfonodo e estadiamento.
Brambilla et al	2007	35	COX-2	IBL, JAPAN	Não correlacionou com metástase.
Agaki et al	2000	99	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA	Estadiamento patológico, profundidade de invasão e sobrevida.
Xiong et al	2005	128	COX-2	monoclonal, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA.	Correlacionou com o estadiamento clínico.
Zhang et al	2010	95	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA	Correlacionou com metástase para linfonodo e sobrevida.
Jia et al	2004	56	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA.	Correlaciona com metástase para linfonodo. Sem correlação para profundidade de invasão e estadiamento patológico.
Zhong	2009	50	VEGF-C	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA	Correlação com metástase para linfonodo,
Yamauchi et al	2000	232	COX-2	Monoclonal, Alexis Co., San Diego, CA	Profundidade de invasão, estadio clínico.

## 2 Justificativa

---

A abordagem conjunta dos marcadores VEGF-C e COX-2 no adenocarcinoma colorretal nunca foi realizada no Brasil. As características dos adenocarcinomas colorretais na população do estado de Goiás também não foram estudadas ainda.

O presente estudo visa descrever algumas características clínicas e patológicas do adenocarcinoma colorretal de pacientes atendidos e tratados em hospital de referência de tratamento de câncer situado no estado de Goiás, delineando o perfil da doença nestes pacientes.

Por suas implicações na carcinogênese e no comportamento do adenocarcinoma colorretal em relação a fatores de influência prognóstica, o estudo dos presentes marcadores visa não só descrever sua expressão nesta população estudada como também as possíveis associações das expressões destas moléculas com fatores prognósticos, quem sabe, no futuro, auxiliando o clínico na conduta terapêutica dos pacientes.

## **3 OBJETIVOS**

---

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial papel prognóstico da expressão de VEGF-C e COX-2, por meio de imuno-histoquímica, em pacientes com adenocarcinoma colorretal, diagnosticados no HAJ/ACCG, no período de 1997 a 2004, associados a dados clínico-patológicos.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

(1) Conhecer os principais aspectos clínicos e patológicos dos pacientes com adenocarcinoma colorretal diagnosticados no HAJ/ACCG, no período de 1997 a 2004, incluindo o estadiamento clínico e patológico.

(2) Investigar o potencial papel prognóstico do estadiamento clínico e patológico no grupo de pacientes estudados.

(3) Avaliar a expressão de COX-2 e VEGF-C, pelo método imuno-histoquímico, nos adenocarcinomas colorretais analisados neste estudo.

(4) Investigar as possíveis associações entre a expressão de COX-2 e VEGF-C com os aspectos clínicos, histopatológicos e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.

(5) Avaliar a sobrevida global câncer-específica dos pacientes com adenocarcinoma colorretal diagnosticados no HAJ/ACCG, no período de 1997 a 2004.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Sujeitos da pesquisa

Estudo retrospectivo, com análise de dados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de um grupo de pacientes com adenocarcinoma colorretal, operados no Hospital Araújo Jorge da ACCG e com as peças cirúrgicas analisadas no Setor de Anatomia Patológica, durante o período de 1997 a 2004.

Os sujeitos do estudo foram pacientes com adenocarcinoma colorretal atendidos consecutivamente e operados no Hospital Araújo Jorge, selecionados a partir dos livros de arquivo de laudos anatomopatológicos do Setor de Anatomia Patológica do HAJ.

Os dados clínicos foram coletados a partir de informações contidas nos prontuários do Hospital Araújo Jorge da ACCG e Laudos de Biópsia dos espécimes cirúrgicos do Setor de Anatomia Patológica e incluíram:

- Informações sobre gênero, idade, data do diagnóstico, localização do tumor, data da cirurgia, tabagismo e consumo de álcool.
- O diagnóstico histológico da doença, o tamanho tumoral, o grau de diferenciação do tumor e a análise de linfonodos comprometidos ou não por metástases. Todas as peças cirúrgicas foram estadiadas segundo a classificação do pTNM;
- Informações sobre a realização de tratamento cirúrgico e quimioterápico ou quimioterápico/radioterápico neoadjuvante ou adjuvante.
- Dados da sobrevivência ou do óbito dos pacientes (data do óbito ou da última consulta).

Os critérios de inclusão foram: Pacientes submetidos à cirurgia do cólon e reto, com retirada de linfonodos na cirurgia curativa, com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma, cujos blocos de parafina encontravam-se disponíveis no Setor de Anatomia Patológica do HAJ e cujos prontuários encontravam disponíveis no Setor de Arquivo do hospital.

Os critérios de exclusão foram: Pacientes cujos blocos de parafina das peças cirúrgicas não se encontravam disponíveis no SAP ou que não tinham seus prontuários disponíveis no Setor de Arquivo do hospital.

Um total de 139 pacientes teve suas peças cirúrgicas analisadas no Setor de Anatomia Patológica no período estabelecido. Cento e trinta e quatro (134) pacientes preencheram os critérios de inclusão e cinco foram excluídos por ausência de bloco de parafina do tumor primário disponível para análise ou por não terem seus prontuários disponíveis.

Os desfechos de interesse eram a presença ou desenvolvimento de metástase para linfonodos regionais e o óbito por adenocarcinoma colorretal. Os casos que evoluíram a óbito por complicações de tratamento ou outra causa, na vigência da doença, foram considerados como óbito câncer-específico. Para cálculo de sobrevida, foi considerada a data da cirurgia do tumor primário (colorretal) como inicial. A censura foi aplicada na data da última consulta aos pacientes vivos e aos mortos por causa não-oncológica e sem adenocarcinoma colorretal em atividade.

O tempo de seguimento dos pacientes foi estabelecido a partir da data do diagnóstico da doença até a data da última consulta ou do óbito.

Os pacientes foram diagnosticados através do exame histopatológico das biópsias com posterior avaliação do espécime cirúrgico.

As cirurgias foram realizadas por pequeno grupo de cirurgiões, empregando protocolo padronizado pelo serviço, conforme a localização e a técnica indicada para cada caso, buscando a extirpação total da neoplasia, sem neoplasia residual visível.

Os estadiamentos clínico e patológico usados foram propostos pelo Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, 7ª edição, 2010 (Sobin & Wittekind 2010), (Quadro 2).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge (protocolo N° 042/2010), (Anexo 1).

#### **4.2 Descrição das amostras, escolha dos blocos de tumor e análise das lâminas (Avaliação qualitativa)**

O diagnóstico das peças cirúrgicas dos pacientes do estudo foi realizado por médicos patologistas do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge (ACCG). As amostras de tecido em blocos de parafina foram selecionadas pela mestranda, que revisou todas as lâminas estocadas, desconhecendo a evolução clínica dos pacientes. Sempre que necessário, os blocos de parafina foram reprocessados para avaliação com hematoxilina e eosina (HE).

A análise histopatológica dos tumores foi realizada para confirmação do diagnóstico. A interpretação dos resultados das marcações por imunohistoquímica foi realizada em separado pela mestranda (EDM) e outra patologista (RCGA) do mesmo serviço a fim de garantir a reprodutibilidade da análise. Os casos estavam identificados com a numeração dada pelo estudo, não permitindo o acesso aos dados clínicos dos pacientes (exame às cegas).

Os casos foram avaliados por microscopia óptica convencional em microscópios Nikon E-200 de forma a classificar as colorações em percentual de positividade em relação a todo o tecido tumoral da amostra, utilizando-se campo quadriculado milimetrado com divisões 1/100 mm para orientar as áreas de neoplasia a serem estudadas e para a análise percentual de positividade das células coradas.

### 4.3 **Análise Imuno-histoquímica**

A análise imuno-histoquímica foi realizada no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge da ACCG. Os tecidos do estudo foram fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em blocos de parafina, que foram cortados em micrótomo rotativo manual Leica, utilizando-se cortes histológicos de 4µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas previamente silanizadas e identificadas. A reação imuno-histoquímica utilizou o método da imunoperoxidase associada a polímeros (Kit comercial MACH4 – *Universal HRP-Polymer kit - BioCare*). Foi realizada a desparafinação em xilol, seguida da hidratação em solução aquosa de álcool etílico, através de uma sequência de alcoóis de 70 a 99 GL e lavagem com água. Em seguida, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor, em panela de pressão, durante cinco minutos, utilizando-se o tampão citrato 0,01M, pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente, para resfriamento, por cerca de uma hora. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 3%, durante 10 minutos, e em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por cinco minutos. O anticorpo primário policlonal anti-VEGF-C produzido em coelho, referência: Z-CVC7, Marca: Invitrogen USA e o anticorpo monoclonal anti-COX-2 produzido em camundongo Clone: COX 229 Marca: Invitrogen USA na titulação de 1:400 para anti-VEGF-C e 1:800 para anti-COX-2 foram incubados em solução de PBS contendo 1% de albumina bovina a 4°C, durante a noite em câmara úmida. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada, foi adicionado o anticorpo secundário (Invitrogen, USA) conjugado com o polímero ligado à peroxidase. Depois de uma nova lavagem com PBS, por cinco minutos, a reação foi revelada com tetra-hidroclorato de 3-3'diaminobenzidina, por cinco minutos, e as lâminas levemente contracoradas com hematoxilina para comparação. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula. Tecidos com positividade comprovada para as proteínas pesquisadas foram incluídos nas reações para cada um dos antígenos, bem como amostras de tecido colorretal normal,

para servirem de controles negativos externos em cada processo.

Os resultados das análises de VEGF-C foram classificados de duas maneiras, uma classificação seguindo o método descrito por Agaki (Agaki et al., 2000) e outra seguindo o método descrito por Soumaoro (Soumaoro et al., 2006). O método descrito por Agaki avalia a expressão da proteína nas células tumorais, considerando a intensidade de marcação e quantidade de células tumorais marcadas. Os casos considerados positivos são aqueles que apresentam intensidade de marcação moderada a forte em mais de 10% das células tumorais coradas. Os casos que apresentavam menos de 10% das células tumorais marcadas ou marcação fraca foram considerados negativos.

Os resultados das análises de VEGF-C, segundo Soumaoro et al., 2006, avaliam a soma dos escores dos percentuais de células tumorais coradas e os escores de intensidade de coloração. Os escores de percentuais de células tumorais coradas variam de 0 a 4 (0, se  $\leq 1\%$ ; 1, se  $> 1$  e  $\leq 20\%$ ; 2, se  $> 20$  e  $\leq 50\%$ ; 3, se  $> 50\%$  e  $\leq 80\%$  ou 4, se  $> 80\%$ ), enquanto a intensidade de marcação varia de 1 a 3 (1= fraca, 2=moderada, 3=forte). Assim, a marcação é considerada positiva para VEGF-C quando o escore final é  $\geq 5$ .

Os resultados das análises de COX-2, segundo Soumaoro et al., 2006, também avaliam a soma dos escores de percentuais de células tumorais coradas e os escores de intensidade de coloração. Os escores de percentuais de células tumorais coradas variam de 0 a 4 (0 = 0%, 1 = 1-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75% ou 4 = 76-100%), enquanto a intensidade de marcação varia de 1 a 3 (1= fraca, 2=moderada, 3=forte). Assim, a marcação é considerada positiva para COX-2 quando o escore final é  $\geq 3$ .

Os dados apresentados neste trabalho consideraram os dois métodos de avaliação para VEGF-C (Agaki et al., 2000 e Soumaoro et al., 2006). Os resultados são mostrados nas tabelas 8 e 9. Já os dados de COX-2, consideraram somente o método de Soumaoro et al., 2006 e os resultados são apresentados na tabela 4.

#### 4.4 Análise estatística

Os dados clínicos, histopatológicos e de imuno-histoquímica foram armazenados e estruturados no programa Excel Microsoft 2007 e analisados no Software Statistical Package of Social Science (SPSS<sup>®</sup>, Chicago, III) para Windows versão 17.0, no Epi Info 7 (Epi Info 7 CDC) e no Med Calc 12 Software version 1993-2011.

Para análise estatística utilizou-se nível de significância de 5% ( $p = 0,05$ ).

A comparação de variáveis contínuas entre os grupos foi feita através do Teste T Student. Os testes de Qui-quadrado e o exato de Fisher foram empregados na análise univariada. Para as taxas de sobrevida foram utilizadas tabelas de vida conforme descrito por Kaplan-Meier (Kaplan,1958), comparadas pelo teste de Log-Rank.

Para o cálculo de sobrevida câncer-específica utilizou-se o desfecho óbito por adenocarcinoma colorretal. A censura foi aplicada na data da última visita médica ou na data do óbito por outra causa.

Para todos os testes foram utilizados o nível de 95% de confiança, sendo considerado significativo o resultado com  $p$  igual ou menor que 0,05.

### 5.1 Características do grupo de estudo

Após a seleção dos casos de adenocarcinomas colorretais, 134 pacientes foram incluídos no estudo, dos quais 77 (57,46%) eram do gênero masculino e 57 (42,54%) do gênero feminino. A idade do grupo variou de 25 a 87 anos, com média de 61,4 anos ( $\pm 15,2$ ) e mediana de 65 anos.

Quanto à distribuição em faixas etárias, 15 pacientes (11, 19%) tinham menos de 40 anos de idade e 119 (88,81%) tinham 40 anos ou mais, sendo que a maior frequência foi observada na faixa etária entre 65 e 75 anos (32,1%).

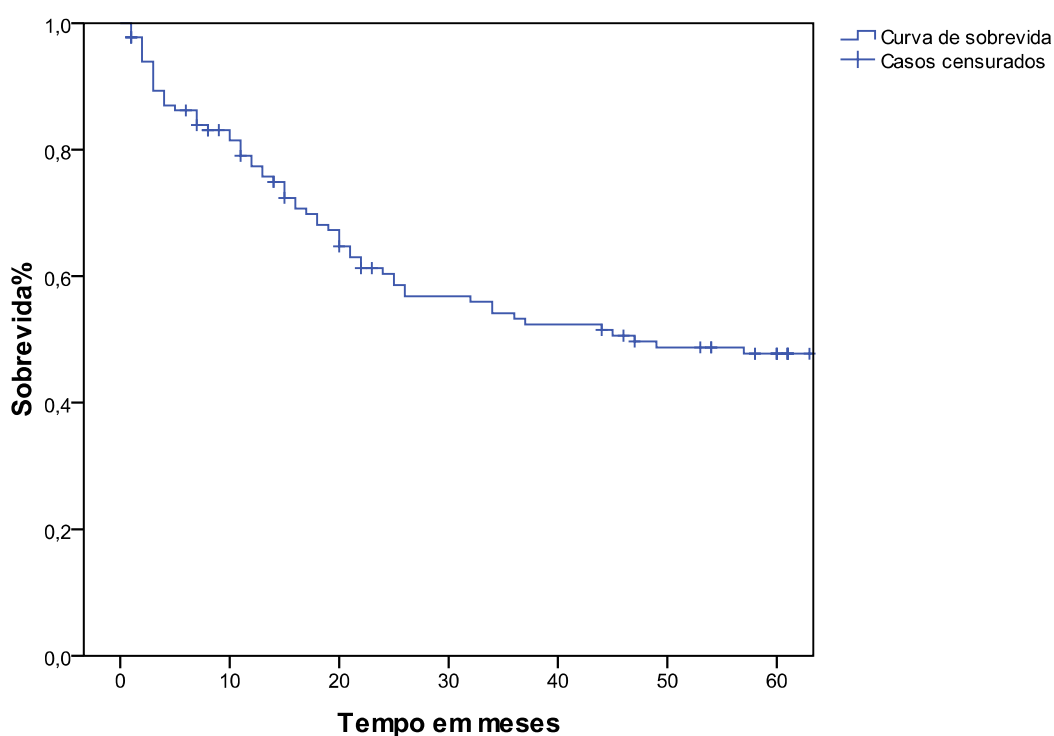
O tamanho tumoral variou de 1,0 cm até 11,0 cm, com média de tamanho de 5,4 cm, indicando que a maioria dos tumores foi maior que 5,0 cm.

Quanto às metástases para linfonodos regionais, 76 (55,6%) pacientes apresentavam metástases à cirurgia. Os resultados demonstraram que, em relação ao estadiamento clínico, 26 (19,40%) pacientes encontravam-se no estadio 1, 32 (23,88%) no estadio 2, 67 (50,0%) no estadio 3 e 9 (6,72%) no estadio 4, (Tabela 1).

O etilismo e o tabagismo foram registrados no grupo, sendo que 46 pacientes (34%) tinham o hábito de fumar e 37 (27,61%) tinham o hábito de ingerir bebidas alcoólicas. Informações sobre tabagismo não foram registradas em 5,2% dos prontuários e informações sobre etilismo estavam ausentes em 6,72% dos mesmos.

## 5.2 Avaliação da sobrevida global dos pacientes do estudo

A sobrevida global em cinco anos para o grupo estudado foi de 50,0%, ou seja, ao final de cinco anos, 67 pacientes (50,0%) foram a óbito em decorrência da doença, (Figura 4).



**Figura 4. Curva de sobrevida global de pacientes com adenocarcinoma colorretal.** Curva de Sobrevida global (Kaplan-Meier), mostrando a sobrevida de 50% em cinco anos para o grupo de pacientes estudado. A linha azul reflete a sobrevida, os cortes na linha correspondem aos casos censurados.

A tabela 3 mostra os resultados referentes às possíveis associações investigadas entre os aspectos patológicos e a sobrevida global dos pacientes do estudo. A sobrevida em cinco anos associou-se de forma inversa com a presença de metástases para linfonodos regionais, ( $p=0,003$ ), bem como com o estadió clínico dos pacientes à época da cirurgia, ( $p=0,01$ ), (Tabela 1).

A sobrevida em cinco anos para os pacientes com comprometimento de linfonodos regionais (metástases para linfonodos regionais) foi de 38,2%, contrastando com 61,8% para os pacientes que não apresentavam metástases linfonodais.

Com relação ao estadiamento clínico, os dados demonstram que dentre os 134 pacientes estudados, os grupos classificados com estadios 1 e 2 apresentaram sobrevida em cinco anos de 65,4% e 65,6%, respectivamente. Entretanto, uma sobrevida significativamente menor foi observada para os pacientes classificados com estadio 3 e 4. Os pacientes com estadio 3 apresentaram sobrevida de 43,3% e nenhum paciente com estadio 4 estava vivo ao final de cinco anos.

Tabela 1. Possíveis associações avaliadas entre os aspectos clínicos e a sobrevida de pacientes com carcinomas colorretais.

Parâmetro	Vivo	Óbito	p	RR(IC)
Metástases para linfonodos				
Positivo	29 (38,2%)	47 (61,8%)	0,003 *	0,58 (0,41 – 0,82)
Negativo	38 (65,5%)	20 (3,5%)		
Invasão				
T1 – T2	23 (62,2%)	14 (37,8%)	0,043*	1,37 (0,98 – 1,91)
T3 – T4	44 (45,4%)	53 (54,6%)		
Grau Histológico				
Baixo grau	62 (51,2%)	59 (48,8%)	0,56*	1,33 (0,65 – 2,71)
Alto grau	5 (38,5%)	8 (61,6%)		
Estadio Clínico				
Estadio 1	17 (65,4%)	9 (34,6%)	0,01**	#
Estadio 2	21 (65,6%)	11 (34,4%)		
Estadio 3	29 (43,3%)	38 (56,7%)		
Estadio 4	0 (0%)	9 (100%)		

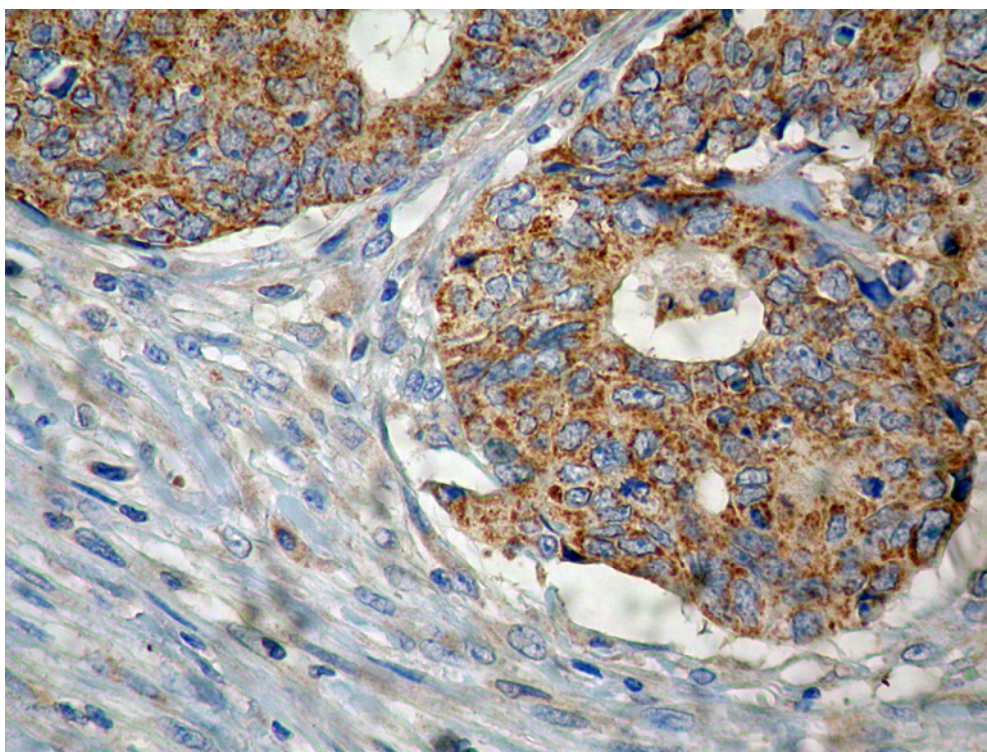
\* Qui-quadrado calculado em tabelas 2x2.

\*\* Fischer calculado quando há n menor que cinco.

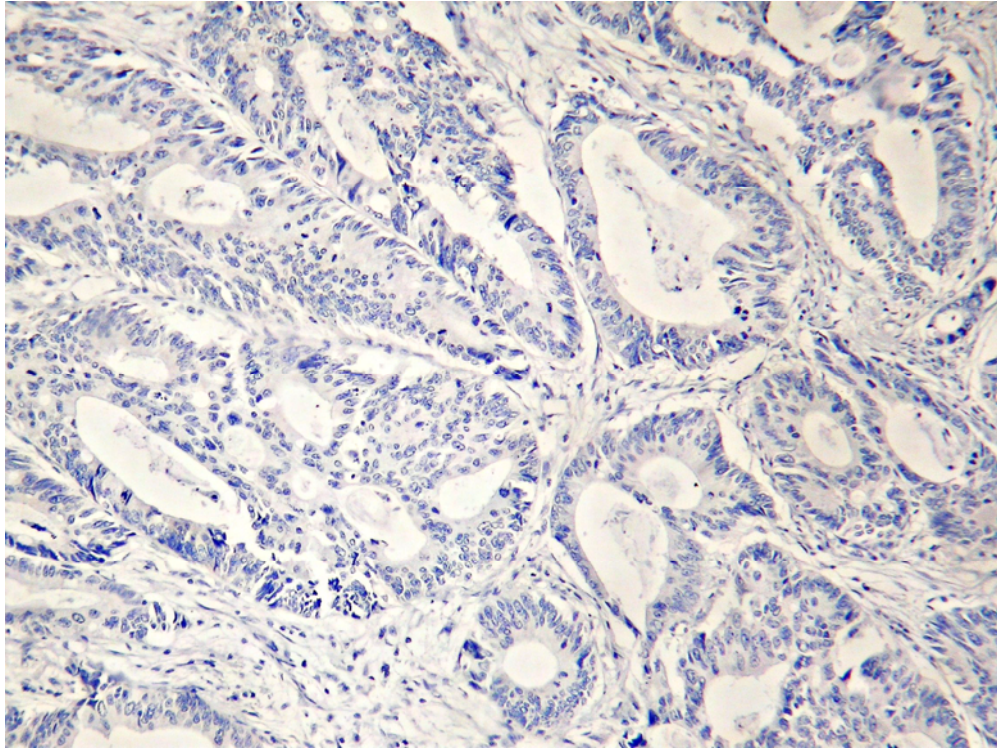
# Não calculado: não foi possível o cálculo por haver valor igual a zero.

### 5.3 Análise imuno-histoquímica da expressão de COX-2 nos adenocarcinomas colorretais

A análise imuno-histoquímica da expressão de COX-2 foi feita de acordo com Soumaoro et al, 2006, conforme descrito anteriormente na metodologia. Todos os casos de adenocarcinoma colorretal analisados neste estudo apresentaram escore de marcação maior ou igual a 3, exceto um caso. A marcação positiva foi visualizada pela coloração marrom-dourada ou acastanhada em grânulos, com intensidade moderada a forte, no interior do citoplasma das células tumorais, sem coloração dos núcleos, que permanecem corados de azul pela hematoxilina, (Figura 5). Um único caso foi classificado com escore negativo para expressão de COX-2, (Figura 6).



**Figura 5. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal com positividade para COX-2.** corte histológico de paciente com adenocarcinoma colorretal com marcação positiva (coloração marrom do citoplasma) para expressão de COX-2, avaliada pelo método imuno-histoquímico. Aumento original de 200x.



**Figura 6. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal negativo para COX-2.** Fotomicrografia de corte histológico de adenocarcinoma de paciente do estudo, com marcação negativa para expressão de COX-2, avaliada pelo método imuno-histoquímico. Aumento original de 100x.

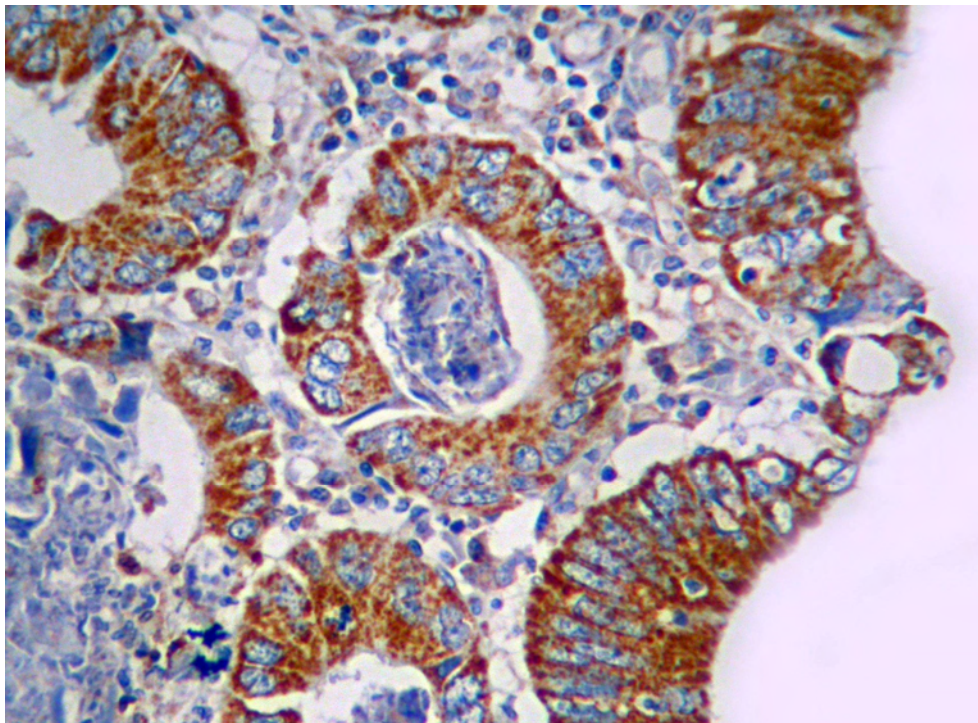
#### **5.4 Análise imuno-histoquímica da expressão de VEGF-C nos adenocarcinomas colorretais**

A análise imuno-histoquímica da expressão de VEGF-C, feita de acordo com Soumaoro et al, 2006, resultou em 90 casos (67,16%) com escore positivo e 44 casos (32,84%) com escore negativo. A marcação positiva foi visualizada pela coloração marrom-dourada ou acastanhada em grânulos, com intensidade moderada a forte, no interior do citoplasma das células tumorais, sem coloração dos núcleos, que permanecem corados de azul pela hematoxilina, (Figura 7).

Utilizando o método de Agaki et al, 2000, a análise da expressão de VEGF-C resultou em 73 casos (54,48%) com escore positivo e 61 casos (45,52%) com escore negativo, (Figura 7).

#### **5.5 Resultados da análise histológica das reações imuno-histoquímicas para VEGF-C**

As reações imuno-histoquímicas positivas para o VEGF-C apresentaram coloração marrom-dourada ou acastanhada no citoplasma das células tumorais dos pacientes do estudo, sendo que se visualiza a positividade através da granulação citoplasmática marrom ou castanha, conforme a intensidade (Figura 7).



**Figura 7. Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal positivo para VEGF-C.** Fotomicrografia de corte histológico de paciente com adenocarcinoma colorretal com marcação positiva para expressão de VEGF-C, avaliada pelo método imuno-histoquímico. Aumento original de 200x.

### **5.5 Associações investigadas entre a expressão de COX-2 com os aspectos clínicos, histopatológicos e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal**

Uma vez que análise de expressão de COX-2 resultou em escores positivos para 133 casos (98,48%), a investigação de possíveis associações entre este marcador e os aspectos clínicos, histopatológicos e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal tornou-se inviável, (Tabela 2).

Tabela 2. Possíveis associações avaliadas entre a expressão de **COX-2** e os aspectos clínicos e histopatológicos dos adenocarcinomas colorretais do grupo de estudo.

Parâmetro	Cox2 +	Cox2 -	p	RR(IC)
<b>Idade</b>				
≤65 anos	68 (100,00%)	0 (0,00%)	0,49**	1,01 (0,98 – 1,05)
>65 anos	65 (98,48%)	1 (1,52%)		
<b>Idade de Risco</b>				
≤40 anos	15 (100,00%)	0 (0,00%)	0,89**	1,01 (0,99 – 1,02)
>40 anos	118 (99,16%)	1 (0,84%)		
<b>Sexo</b>				
Masculino	77 (100,0%)	0 (0,00%)	0,42**	1,01 (0,98 – 1,05)
Feminino	56 (98,25%)	1 (0,75%)		
<b>Invasão</b>				
T1 – T2	36 (97,3%)	1 (2,7%)	0,28**	0,97 (0,92 – 1,03)
T3 – T4	97 (100,0%)	0 (0,0%)		
<b>Metástase Linfonodal</b>				
Positivo	75 (98,68%)	1 (1,32%)	0,57**	0,99 (0,96 – 1,01)
Negativo	58 (100,0%)	0 (93,2%)		
<b>Grau Histológico</b>				
Baixo grau	120 ( 99,17%)	1 (0,83%)	0,90**	0,99 (0,98 – 1,01)
Alto grau	13 (100,0%)	0 (0,0%)		
<b>Estadio Clínico</b>				
Estadio 1	26 (100,0%)	0 (0,0%)	0,057**	#
Estadio 2	32 (100,0%)	0 (0,0%)		
Estadio 3	66 (98,51%)	1 (1,49%)		
Estadio 4	9 (100,0%)	0 (0,0%)		
<b>Sobrevida</b>				
Vivo	66 (98,51%)	1 (1,49%)	0,50**	0,98 (0,96 - 1,01)
Óbito	67(100,0%)	0 (0,00%)		

\* Qui-quadrado calculado em tabelas 2x2.

\*\* Fischer calculado quando há n menor que cinco.

# Não calculado: não foi possível o cálculo por haver valor igual a zero.

### **5.7 Associações investigadas entre a expressão de VEGF-C com os aspectos clínicos e histopatológicos dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.**

A análise imuno-histoquímica da expressão de VEGF-C, feita de acordo com Soumaoro et al, 2006, possibilitou a classificação dos pacientes deste estudo em dois grupos, sendo um com expressão positiva para VEGF-C (90 casos/67,16%), e outro com expressão negativa (44 casos/ 32,84%). As possíveis associações entre o status de VEGF-C e os aspectos clínicos e histopatológicos encontram-se descritas na tabela 3.

Não foi observada associação estatisticamente significativa com os aspectos clínico-patológicos estudados, (Tabela 3).

Utilizando o método de Agaki et al, 2000, a classificação dos pacientes deste estudo também resultou em dois grupos, sendo um com expressão positiva para VEGF-C (73 casos/54,48%) , e outro com expressão negativa (61 casos/45,52%). As possíveis associações entre o status de VEGF-C e os aspectos clínicos e histopatológicos encontram-se descritas na tabela 4.

Associações estatisticamente significativas foram observadas entre a positividade de VEGF-C segundo Agaki et al. 2000 e metástases para linfonodos regionais ( $p=0,01$ ) e também entre a positividade de VEGF-C e o estadió clínico dos pacientes ( $p=0,005$ ), (Tabela 4).

Tabela 3. Possíveis associações avaliadas entre os aspectos clínicos e a expressão de **VEGF-C** em pacientes com carcinomas colorretais, segundo o método de avaliação de **Soumaoro et al.**

\* Qui-quadrado calculado em tabelas 2x2.

Parâmetro	VEGF-C (+)	VEGF-C (-)	p	RR(IC)
<b>Idade</b>				
≤65 anos	47 (69,12%)	21 (30,88%)	0,76*	1,06 (0,84 – 1,34)
>65 anos	43 (65,15%)	23 (34,85%)		
<b>Idade de Risco</b>				
≤40 anos	11 (73,33%)	4 (26,67%)	0,41**	1,04 (0,79 – 1,54)
>40 anos	79 (66,39%)	40 (33,61%)		
<b>Sexo</b>				
Masculino	51 (66,23%)	26 (33,77%)	0,93*	0,97 (0,76 – 1,23)
Feminino	39 (68,42%)	18 (31,58%)		
<b>Invasão</b>				
T1 – T2	24 (64,86%)	13 (35,14%)	0,88*	0,95 (0,72 – 1,25)
T3 – T4	66 (68,04%)	31 (31,96%)		
<b>Metástase Linfonodal</b>				
Positivo	54 (71,05%)	22 (28,95%)	0,36 *	1,14 (0,89 – 1,47)
Negativo	36 (62,07%)	22 (37,93%)		
<b>Grau Histológico</b>				
Baixo grau	82 (67,77%)	39 (32,23%)	0,88*	1,10 (0,70 – 1,72)
Alto grau	8 (61,54%)	5 (38,46%)		
<b>Estadio Clínico</b>				
Estadio 1	16 (61,54%)	10 (38,46%)	0,23*	#
Estadio 2	20 (62,50%)	12 (37,50%)		
Estadio 3	46 (68,66%)	21 (31,34%)		
Estadio 4	8 (88,89%)	1 (11,11%)		
<b>Sobrevida</b>				
Vivo	43 (64,18%)	24 (35,82%)	0,23*	0,91 (0,72 - 1,16)
Óbito	47 (70,15%)	20 (29,85%)		
<b>Cox-2</b>				
Positivo	90 (67,67%)	43 (32,33%)	0,33**	#
Negativo	0 (00,00%)	1 (100,0%)		

\*\* Fischer calculado quando há n menor que cinco.

# Não calculado: não foi possível o cálculo por haver valor igual a zero.

Tabela 4. Possíveis associações avaliadas entre os aspectos clínicos e histopatológicos e a expressão de **VEGF-C** em pacientes com carcinomas colorretais, segundo o método de avaliação de **Agaki et al.**

<b>Parâmetro</b>	<b>VEGF-C (+)</b>	<b>VEGF-C (-)</b>	<b>p</b>	<b>RR(IC)</b>
<b>Idade</b>				
≤65 anos	43 (63,24%)	25 (36,76%)	0,06*	1,39 (1,01 – 1,92)
>65 anos	30 (45,45%)	36 (54,55%)		
<b>Idade de Risco</b>				
≤40 anos	11 (73,33%)	4 (26,67%)	0,06*	1,41 (0,99 – 1,10)
>40 anos	62 (52,10%)	57 (47,90%)		
<b>Sexo</b>				
Masculino	45 (58,44%)	32 (41,56%)	0,15*	1,19 (0,86 – 1,64)
Feminino	28 (49,12%)	29 (50,88%)		
<b>Invasão</b>				
T1 – T2	16 (43,24%)	21 (56,76%)	0,16*	0,77 (0,52 – 1,13)
T3 – T4	57 (58,76%)	40 (41,24%)		
<b>Metástase Linfonodal</b>				
Positivo	48 (63,16%)	28 (36,84%)	0,01 *	1,46 (1,04 – 2,06)
Negativo	25 (43,10%)	33 (56,90%)		
<b>Grau Histológico</b>				
Baixo grau	66 (54,55%)	55 (45,45%)	0,80*	1,01 (0,60 – 1,72)
Alto grau	7 (53,85%)	6 (46,15%)		
<b>Estadio Clínico</b>				
Estadio 1	9 (34,62%)	17 (65,38%)	0,005*	#
Estadio 2	16 (50,00%)	16 (50,00%)		
Estadio 3	40 (59,70%)	27 (40,30%)		
Estadio 4	8 (88,89%)	1 (11,11%)		
<b>Status</b>				
Vivo	33 (49,25%)	34 (50,75%)	0,12*	0,82 (0,60 - 1,13)
Óbito	40 (59,70%)	27 (40,30%)		
<b>Cox-2</b>				
Positivo	73 (54,89%)	60 (45,11%)	0,45**	#
Negativo	0 (00,00%)	1 (100,0%)		

\* Qui-quadrado calculado em tabelas 2x2.

\*\* Fischer calculado quando há n menor que cinco.

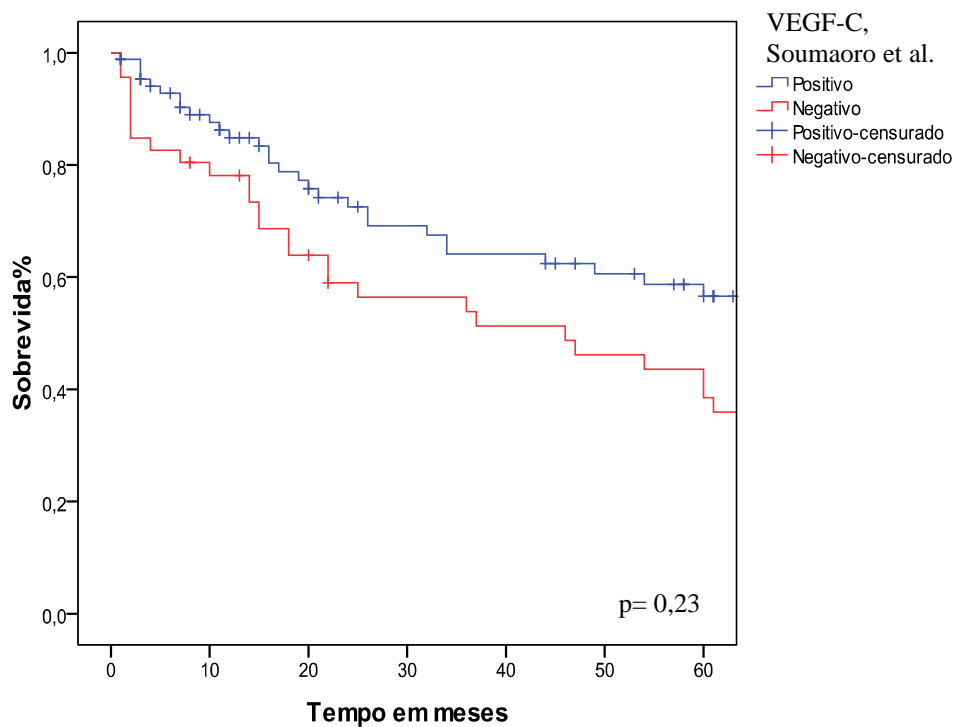
# Não calculado: não foi possível o cálculo por haver valor igual a zero.

## **5.8 Associações investigadas entre a expressão de VEGF-C e a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal**

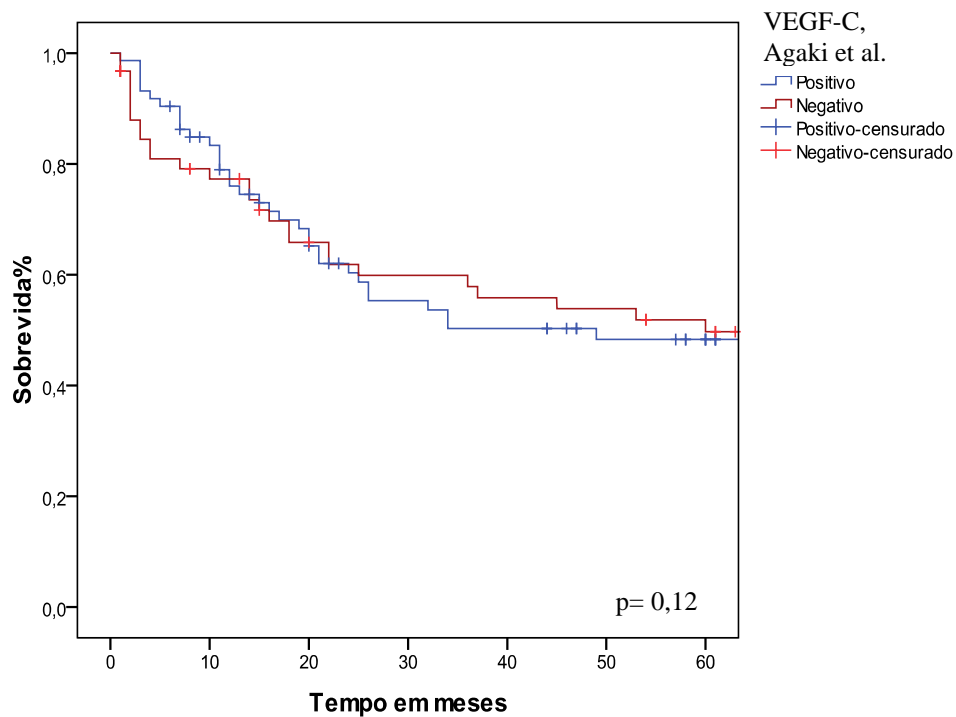
As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em relação ao status de VEGF-C são representadas nas figuras 8 e 9.

De acordo com a avaliação de VEGF-C pelo método de Soumaoro et al, 2006, a sobrevida em cinco anos para os pacientes com status positivo de VEGF-C foi de 64,18% comparada com uma sobrevida de 70,15% para os pacientes com *status* negativo de VEGF-C ( $p=0,23$ ), (Figura 8).

De acordo com a avaliação de VEGF-C pelo método de Agaki et al, 2002, a sobrevida em cinco anos para os pacientes com status positivo de VEGF-C foi de 49,25% comparada com uma sobrevida de 59,70% para os pacientes com status negativo de VEGF-C ( $p=0,12$ ), (Figura 9).



**Figura 8. Associação da expressão de VEGF-C em adenocarcinomas colorretais, segundo Soumaoro et al., 2006.** Associação da expressão de VEGF-C segundo Soumaoro et al, 2006 com a sobrevida global em cinco anos. A linha azul representa os casos positivos para VEGF-C e linha vermelha pontilhada representa os casos negativos. Os cortes nas linhas de sobrevida correspondem aos casos censurados.



**Figura 9. Associação da expressão de VEGF-C, segundo Agaki et al., em adenocarcinomas colorretais.** Associação da expressão de VEGF-C, segundo Agaki et al, 2002, com a sobrevida global em cinco anos. A linha azul representa os casos positivos para VEGF-C e linha vermelha pontilhada representa os casos negativos. Os cortes nas linhas de sobrevida correspondem aos casos censurados.

## 6. Discussão

---

Este é o primeiro estudo brasileiro enfocando o papel da COX-2 e do VEGF-C no adenocarcinoma colorretal. Também é o primeiro estudo comparando os métodos de avaliação de VEGF-C segundo Soumaoro et al., 2006 e segundo Agaki et al., 2000 em adenocarcinomas colorretais.

A via linfática é o principal mecanismo de disseminação dos adenocarcinomas colorretais e dos tumores do trato gastrointestinal de forma geral (Jia et al. 2004; Robbins & Cotran, 2008 WHO 2010). A COX-2 é considerada como promotora da linfangiogênese pela supra-regulação do VEGF-C (Gou et al. 2011) e o VEGF-C é o mais potente linfangiogênico conhecido (Inda et al. 2009).

À medida que estudos têm tentado demonstrar que a análise de fatores moleculares são alvos potenciais para o melhor entendimento e até mesmo o tratamento da doença, as moléculas VEGF-C e COX-2 tem sido estudadas com resultados que implicam em suas participações na tumorigênese do câncer colorretal ou ainda na associação com a piora do prognóstico nos pacientes que apresentam expressão destas proteínas em seus tumores (Zhen-Yang et al. 2011). O método imuno-histoquímico tem-se mostrado útil para tanto, sendo um método difundido mundialmente, de manejo relativamente simples e de custo mais acessível do que a maioria das técnicas mais sofisticadas de detecção de alvos moleculares.

A população do estudo representa a doença, possuindo características semelhantes às de outras populações estudadas do ponto de vista do comportamento clínico, histopatológico e de sobrevida global câncer-específica. O comprometimento de linfonodos regionais e o estadiamento foram os fatores mais importantes de influência para a sobrevida do grupo estudado, semelhante a outros grupos estudados, (Sheehan 1999; Leslie et al. 2002; Le Voyer 2003; Inca 2011; WHO 2010).

O Hospital Araújo Jorge, onde os pacientes foram recebidos para tratamento, é um centro de referência em tratamento de câncer, abrangendo a Região Centro-Oeste,

recebendo pacientes do estado de Goiás (da capital de de cidades do interior) e também pacientes vindos de outros estados como Mato Grosso e Tocantins. Grande parte dos pacientes portadores de adenocarcinomas colorretais apresentaram-se em estadios mais avançados (3 e 4), isso provavelmente devido ao caráter silencioso da doença em seus estágios iniciais e também devido ao fato do Hospital Araújo Jorge, como entidade filantrópica atender mais de 65% de clientela do Sistema Único de Saúde (SUS) e estes pacientes costumam enfrentar problemas sócio-econômicos que culminam num atraso na procura e na obtenção de atendimento médico.

Nos pacientes de nosso estudo observamos uma associação entre a expressão do VEGF-C e metástases para linfonodos regionais quando utilizamos o método de quantificação descrito por Agaki et al, 2000, e não observamos nenhuma associação entre o VEGF-C e os aspectos estudados quando utilizamos o método de Soumaoro et al. 2006, (Tabelas 3 e 4). O resultado da associação do VEGF-C (pelo método de Agaki et al. 2000) com metástases para linfonodos regionais vai de encontro aos achados de alguns autores com publicações mais recentes recentes (Hu et al. 2007; Zhong 2009; Zhang et al. 2010; Du at al. 2011). Isso poderia ser explicado pela ativação da linfangiogênese pelo VEGF-C, facilitando a disseminação tumoral, (George et al. 2001; Soumaoro et al. 2006; Nakamoto et al. 2007; Inda et al. 2009).

O método de Agaki et al. 2000, neste grupo demonstrou maior utilidade, uma vez que o comprometimento de linfonodos e o estadió clínico são fatores prognósticos de crucial importância no câncer colorretal, (Le Voyer et al. 2003; WHO 2010), ressaltando que os estudos tornam-se cada vez mais relevantes na tentativa de esclarecer pontos ainda não totalmente estabelecidos que possam auxiliar no tratamento mais direcionado e eficaz e na melhor estimativa de prognóstico e, possivelmente auxiliar na distinção entre pacientes que poderiam responder ao tratamento com anticorpos anti-angiogênicos e pacientes refratários ou com baixa resposta.

A expressão de COX-2 foi alta em todos os tumores estudados, menos em um caso, não apresentando correlação com nenhum dos parâmetros clínico-patológicos avaliados, (Tabela 2). A participação da COX-2 na tumorigênese do adenocarcinoma colorretal, em nossa opinião, explica a alta expressão desta citocina, (Dempke at al. 2001; Rizzo 2011).

As células tumorais produzem fatores de crescimento endotelial vascular, dentre eles o VEGF-C, com finalidade principal de nutrição, porém a ação esperada destas citocinas depende de suas interações com os respectivos receptores a fim de desencadear os eventos moleculares que culminarão no efeito angiogênico e linfangiogênico. Portanto, reconhecemos que não é somente a expressão dos fatores angiogênicos e linfangiogênicos que deve ser estudada, mas sim desenvolver estudos mais abrangentes no sentido de encontrar o elo entre a expressão do VEGF-C e o evento angiogênico/linfangiogênico final.

Uma vez que estudos demonstraram na prática a eficácia do tratamento utilizando anticorpos monoclonais anti-VEGF para o adenocarcinoma colorretal metastático (Hurwitz et al. 2004; Marquardt et al. 2009; Tol et al. 2009), e do fato de os resultados dos estudos com VEGF-C e COX-2 ainda serem conflitantes (Masunaga et al. 2000; Soumaoro et al. 2006; Nakamoto et al. 2007; Babrilla et al. 2007; Zhong et al. 2009; Du et al. 2011), talvez o estudo concomitante da expressão dos receptores, da fração de ligação citocina-receptor e ainda dos possíveis agentes anti-angiogênicos produzidos no estroma tumoral como uma reação do hospedeiro, possa esclarecer melhor sobre o comportamento tumoral.

Em nosso estudo, não observamos associação entre a expressão da COX-2 e do VEGF-C, possivelmente por que neste grupo de pacientes o VEGF-C não é dependente da via da ciclooxygenase 2 para a angiogênese, (Tabela 2).

Em relação à associação com a sobrevida câncer-específica em cinco anos, os resultados de VEGF-C por ambos os métodos estudados (Soumaoro et al. 2006 e Agaki et al. 2000) apresentaram-se semelhantes, ( $p > 0,05$ ), não havendo associação entre a expressão de VEGF-C e a sobrevida, (Tabelas 3 e 4; Figuras 11 e 12). A utilização de dois métodos de análise de expressão de VEGF-C reforçou a ausência de associação da expressão de VEGF-C com a sobrevida câncer-específica, neste grupo.

Poucos pacientes no estudo apresentavam-se no estadio 4 (nove pacientes). Isso ocorreu por que o adenocarcinoma colorretal de estadio 4 apresenta tumores maiores, alguns com invasão de estruturas adjacentes, por vezes, não sendo ressecáveis ou ainda por que pacientes não possuíam condições clínicas que permitissem a cirurgia, deste modo, não preenchendo os critérios de inclusão do estudo por ausência de peça cirúrgica para análise do tumor.

Uma vez que o tratamento anti-angiogênico utilizando anticorpos monoclonais é feito com boa resposta em pacientes com adenocarcinomas colorretais metastáticos, consideramos que o VEGF-C e seu receptor são alvos promissores na tentativa de estabelecer marcadores prognósticos de progressão tumoral e de sobrevida. Isso poderia ajudar, no futuro, na seleção de pacientes que se beneficiariam do tratamento com medicamentos anti-angiogênicos antes mesmo do aparecimento de metástases (evitando-as), melhorando significativamente a sobrevida e a qualidade de vida dos mesmos.

## **7. Conclusão**

---

Os pacientes do estudo demonstraram serem semelhantes a outros grupos de pacientes com adenocarcinomas colorretais em suas características clínico-patológicas, semelhante aos estudos descritos em publicações nacionais e internacionais.

Os achados do presente estudo sugerem que a análise da expressão de VEGF-C pode ajudar a identificar pacientes com maior risco de progressão da doença por sua associação com a presença de metástases para linfonodos regionais e com o estadiamento clínico.

## REFERÊNCIAS

Achen MG, Mann GB, Stacker AS 2006. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *British Journal of Cancer* 94: 1355-1360.

Agaki K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, Sugimachi K 2000. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *British Journal of Cancer* 83(7): 887-891.

Baron JA, RS Sandler 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med* 51: 511-23.

Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG 2005. Colon Cancer Survival Is Associated With Decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 34: 8706-12.

Bernardeau-Mozer M, Chaussade S 2004. Cyclooxygenase2 inhibitors and colorectal cancer. *Bull Cancer* 1: 91 Suppl 2: S89-98.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND 2010. In *WHO classification of the Tumours of The Digestive System*. IARC, Lyon, pp 132-51.

Boyle P, Levin B 2008. *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press.

Brambilla E, Moreira LF, Serafini EP 2007. Avaliação Imunoistoquímica da Proteína Ciclooxygenase-2 nas Neoplasias Colorretais e sua Relação com Fatores Patológicos Prognósticos. *Rev bras Coloproct*, 27: 256-263.

Bross PF, J Beitz, G Chen, XH Chen, E Duffy, L Kieffer, S Roy, R Sridhara, Rahman A; Williams G 2001. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 7(6): 1490-6.

Castells A, Payá A, Alenda C, Rodríguez-Moranta F, Agrelo R, Andreu M, Piñol V, Castellví-Bel S, Jover R, Llor X, Pons E, Elizalde JI, Bessa X, Alcedo J, Saló J, Medina E, Naranjo A, Esteller M, Piqué JM. Cyclooxygenase2 expression in colorectal cancer with DNA mismatch repair deficiency. *Clin Cancer Res* [serial on the Internet] 2006

[Downloaded from [clincancerres.aacrjournals.org](http://clincancerres.aacrjournals.org) on March 11, 2012] 6: 1686-92.  
Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/6/1686.full.pdf>

Christensen LL, Madsen BE, Wikman FP, Wiuf C, Koed K, Tjønneland A, Olsen A, Syvänen A-C, Andersen CL, Ørntoft TF 2008. The association between genetic variants in *hMLH1* and *hMSH2* and the development of sporadic colorectal cancer in the Danish population. *BMC Medical Genetics* 9: 52.

Coussens LM, Werb Z 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-7.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C et al. 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351(4): 337-45.

Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ 1999. Tromboxane A<sub>2</sub> Is a Mediator of Cyclooxygenase-2-dependent Endothelial Migration and Angiogenesis. *Cancer Research* 59: 4579-4577.

Dannenber AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Eksler BB and Subbaramaiah K 2001. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2: 544-51.

Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmol HJ 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 411-417.

Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Söderkvist P 1999. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut* 45: 730-732.

Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H. Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 38: 540-4.

Du B, Yang ZY, Zhong XY, Fang M, Yan YR, Qi GL, Pan YL, Zhou XL 2011. Metastasis-associated protein 1 induces VEGF-C and facilitates lymphangiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 17: 1219-1226.

Dukes CE, Bussey HJR 1958. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 12: 309-20.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., editors 2010. In AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, p. 143-164.

Escudier B; J Cosaert ,S Jethwa (2008). Targeted therapies in the management of renal cell carcinoma: role of bevacizumab. *Biologics* 2(3): 517-30.

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2011.

Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.

Friis S; A Poulsen; L Pedersen; JA Baron ,HT Sorensen 2006. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of oral cancer: a cohort study. *Br J Cancer* 95(3): 363-5.

Folkman J 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285: 1182-1186.

Folkman F 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175: 409-416.

Fosslien E 2000. Biochemistry of cyclooxygenase (COX-2) inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 37(5):431-502.

Fu SL; YL Wu; YP Zhang; MM Qiao ,Y Chen 2004. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 10(13): 1971-4.

Fujita M, Fukui H, Kusaka T, Ueda Y, and Fujimori T 2000. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase (COX)-2 in colorectal adenomas. *J Gastroenterol* 35: 488-490.

Fux R, Schwab M, Thon KP, Gleiter CH, Fritz P 2005. Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clin Cancer Res.* 11(13):4754-60.

George ML; Tutton MG; Janseen F; Arnaout A; Abulatfi AM; Eccles, SA and Swift, IR 2001. VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D in colorectal cancer Progression. *Neoplasia* 3: 420-427.

Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC 2010. COX-2 as a target for cancer Chemotherapy. *Pharmacological Reports* 62: 233-244.

Gong Z, Bostick RM, Xie D, Hurley TG, Deng Z, Dixon DA, Zhang J, Hebert JR 2009. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 genes and risk of colorectal adenoma. *Int J Colorectal Dis.* 24(6):647-54.

Gou HF, Chen XC, Zhu J, Jiang M, Yand Y, Cao D, Hou M 2011. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer: correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30:14.

Grady WM 2004. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23: 11-27.

Grau MV; RS Sandler; G McKeown-Eyssen; RS Bresalier; RW Haile; EL Barry; DJ Ahnen; J Gui; RW Summers ,JA Baron 2009. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use after 3 years of aspirin use and colorectal adenoma risk: observational follow-up of a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 101(4): 267-76.

Harris L; H Fritsche; R Mennel; L Norton; P Ravdin; S Taube; MR Somerfield; DF Hayes ,RC Bast, Jr. 2007. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25(33): 5287-312.

Hasegawa K, Ichikawa W, Fujita T, Ohno R, Okusa T, Yoshinaga K, Sugihara K 2001. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas. *European Journal of Cancer* 37: 1469-1474.

Horta BA, Sodero AC, Alencastro RB 2009. Investigating differential activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors. *J Mol Graph Model.* 28(3): 287-296.

Hsi LC, Angerman-Stewart J and Eling TE 1999. Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. *Carcinogenesis col.* 20(11): 2045-2049.

Hu WG, Li JW, Feng B, Beveridge M, Yue F, Lu AG, Ma JJ, Wang ML, Guo Y, Jin XL, Zheng MH 2007. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel

prognostic markers in colorectal carcinoma using qualitative image analysis. *Eur Surg Res.* 39(4):229-38.

Hull MA, Fenwick SW, Scott CN, Toogood GJ and Lodge P 2000. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases. *Clinical and Experimental Metastasis* 18: 21-27.

Hull M and Langman M 2000. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut* 47: 154-158.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F 2004. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *n engl j med* 350;23.

Imperiale TF 2003. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 348: 879.

Inda AM, García MN, Andrini LB, Garcia AL, Blanco AF, Furnus CC, Galletti SM, Brandoni J, Martinez JG, Prat GD and Errecalde AL 2009. Evaluation of Angiogenesis with the Expression of VEGF-C and CD34 in Human Colon Cancer. *Current Chemical Biology* 3: 302-305.

Jass Jr 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50: 223-30.

Jass JR 2002. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin N Am* 82: 891.

Jemal A, Ward E, Thun M 2010. Declining Death Rates Reflect Progress against Cancer. *PLoS ONE* 5(3): e9584. doi:10.1371/journal.pone.0009584.

Jia YT, ZX, He YT, Liang W, Yang HC, Ma HJ 2004. Expression of vascular endothelial growth factor-C and the relationship between lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 10(22):3261-3263.

Kapiteijn E, Marijnen CAM, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJT, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken HJM, Leer JWH and van de Velde CJH 2001. Preoperative Radiotherapy Combined with Total Mesorectal Excision for Resectable Rectal Cancer. *N Engl J Med* 345:638-646.

- Karnes-Jr WE 2000. Implications of Low COX-2 Expression in Colorectal Neoplasms With Defective DNA Mismatch Repair. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 34: 23-27.
- Kinzler KW, Vogelstein B 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159.
- Kirchner T, Reu S 2008. Development of molecular-pathologic entities of colorectal cancer. *Pathologie* 29 Suppl 2: 264-269.
- Knudson AG 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 157.
- Kosmider S, Lipton L 2007. Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 13(28):3799-3805.
- Leslie A, Steele RJ 2002. Management of colorectal cancer. *Postgrad Med J* 78(922):473-8.
- Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ and Haller DG 2003. Colon Cancer Survival Is Associated With Increasing Number of Lymph Nodes Analyzed: A Secondary Survey of Intergroup Trial INT-0089. *J Clin Oncol*. 21(15):2912-9.
- Levin B, Liebman DA, MacFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J et al 2008. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps : a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 134: 1570-1595.
- Luciani MG, Campregher C, Fortune JM, Kunkel TA and Gasche C 2007. 5-ASA Affects Cell Cycle Progression in Colorectal Cells by Reversibly Activating a Replication Checkpoint. *Gastroenterology* 132(1): 221–235.
- Lupinacci RM, Campos FGCM, Araújo SEA, Imperiale AR, Seid VE, Gama A, Kiss DR, Gama-Rodrigues JJ 2003. Análise comparativa das características clínicas, anátomo-patológicas e sobrevida entre pacientes com câncer colo-retal abaixo e acima de 40 anos de idade. *Rev bras Coloproct* 23(3):155-162.

Madaan S; PD Abel; KS Chaudhary; R Hewitt; MA Stott; GW Stamp, EN Lalani 2000. Cytoplasmic induction and over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. *BJU Int* 86(6): 736-41.

McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomsom J, Fyfe N, Hope M, Mowat NAG, Drews JE, El-Omar EM 2011. The Inflammatory Microenviroment in Colorectal Neoplasia. *PLos One*; Vol 23, Issue 1, e15366.

Marquardt F, Rödel F, Capalbo G, Weiss C, Rödel C 2009. Molecular targeted treatment and radiatin therapy for rectal cancer. *Strahlenther Onkol.* 185(6):371-8.

Nakamoto RH, Uetake H, Iida S, Kolev YV, Soumaoro YT, Yasuno M and Suguhara K 2007. Correlations between Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenic Factors in Primary Tumours and Liver Metastases in Colorectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 37(9) 679-685.

Okines A, Cunningham D 2009. Current perspective: bevacizumab in colorectal cancer – a time for reappraisal?. *Eur J Cancer* 45(14): 2452-61.

Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S, Chayama K 2004. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 95(1):32-9.

Pande R, Sunga A, Levea C, Wilding GE, Bshara W, Reid M et al 2008. Significance of signet-ring cells in pacients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 51: 50-55.

Perea J, Lomas M and Hidalgo M 2011. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev esp Enferm Dig (Madrid)* Vol. 103. Nº 1, pp. 29-35.

Pierobon M, Calvert V, Belluco C, Garaci E, Deng J, Lise M, Nitti D, Mammano E, De Marchi F, Liotta L, Petricoin E 2009. Multiplexed cell signaling analysis of metastatic and nom metastatic colorectal cancer reveals COX2-EGFR signaling activation as a potential prognostic pathway biomarker. *Clin Colorectal Cancer.* 8(2):110-7.

Projeto Diretrizes: Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 14 de agosto de 2001.

Rizzo MT 2011. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica Chimica Acta* 412: 671-687.

Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 2005, Elsevier Editora Ltda.

Santos-Jr JCM 2009. Câncer ano-retó-cólico: aspectos atuais - câncer de reto: tratamento cirúrgico. *Rev bras. colo-proctol.* 29(1).

Sarkar FH; S Adsule; Y Li ,S Padhye 2007. Back to the future: COX-2 inhibitors for chemoprevention and cancer therapy. *Mini Rev Med Chem* 7(6): 599-608.

Selves J 2009. Histological types and prognostic factors in colorectal cancer. *Med Sci* 25 Spec No.1: 9-12.

Sheehan, KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ and Murray F 1999. The Relationship Between Cyclooxygenase-2 Expression and Colorectal Cancer. *JAMA* 282(3).

Santos-Jr JCM 2009. Câncer ano-retó-cólico: aspectos atuais - câncer de reto: tratamento cirúrgico. *Rev bras. colo-proctol.* 29(1).

Sarkar FH; S Adsule; Y Li ,S Padhye 2007. Back to the future: COX-2 inhibitors for chemoprevention and cancer therapy. *Mini Rev Med Chem* 7(6): 599-608.

Selves J 2009. Histological types and prognostic factors in colorectal cancer. *Med Sci* 25 Spec No.1: 9-12.

Sheehan, KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ and Murray F 1999. The Relationship Between Cyclooxygenase-2 Expression and Colorectal Cancer. *JAMA* 282:13.

Sobin LH, Gospodarowicz and Wittekind C. Colon and rectum. *TNM Classification of Malignant tumours.* 7 th edition. Blackwell publishing; 2010. p. 100-105

Soreide K, Nedrebo BS, Reite A, Thorsen K, Komer H 2009. Endoscopy, morphology, morphometry and molecular markers: predicting cancer risk in colorectal adenoma. *Expert Rev Mol Diagn* 9: 125-137.

Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y, Iida S, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K 2006. Coexpression of VEGF-C and COX-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum.* 49(3):392-8.

Stolte M 2003. The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages. *Virchows Arch* 442: 99-106.

Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJM, Schrama JG, Erdkamp FLG, Vos AH, van Groeningen CJ, Sinnige HAM, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JHJM, Dalesio O, Punt CJA 2009. Chemotherapy, Bevacizumab, and Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *n engl j med* 360;6.

Van der Voort van Zijp J, Hoekstra HJ, Basson MD 2008. Evolving management of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 14(25):3956-67.

Wei EK 2004. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 108: 433.

Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, et al 1999. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 17:3553-9.

Wolpin BM, Mayer RJ 2008. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134(5):1296-310.

Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ 2007. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 57(3):168-85.

Xiong B, Sun TJ, Hu WD, Cheng FL, Mao M, Zhou YF 2005. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 11(8): 1105-1108

Xu T, Chen D, Chen J 2004. Expression of vascular endothelial growth factor C and its correlation with lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 24(6):596-8.

Zhang H and Sun XF 2002. Overexpression of Cyclooxygenase-2 Correlates With Advanced Stages of Colorectal Cancer. *AJG – Vol. 97, No. 4.*

Zhang C, Hao L, Wang L, Xiao Y, Ge H, Zhu Z, Luo Y, Zhang Y, Zhang Y 2010. Elevated IGFIR expression regulating VEGF and VEGF-C predicts lymph node metastasis in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 10:184 doi:10.1186/1471-2407-10-184.

Zhong D, Li Y, Peng Q, Zhou J, Zhou Q, Zhang R and Liang H 2009. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 8: 689-695.

## **ANEXO 1**

---

**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):** Dra. Eliana Duarte Mota

**ORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis

**TÍTULO:** “Correlação do VGEF-C e COX-2 em adenocarcinomas colorretais como preditores de potencial metastático e prognóstico”.

**Área Temática:** Grupo III

**Área de Conhecimento:** Ciências da Saúde/Medicina

**Local de Realização:** Hospital Araújo Jorge/ACCG – Anatomia Patológica

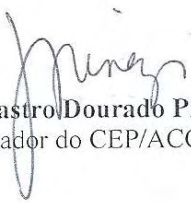
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou \*com recomendação** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

**\*Recomendamos:** Considerando o perfil dos sujeitos da pesquisa, sugerimos a verificação da possibilidade de realização do estudo no GAPPO. Se houver esta possibilidade, apresentar carta de ciência e autorização do local.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões), resultados e publicação (ões).

O CEP/ACCG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em pesquisa – Item 13*).

  
**Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi**  
Vice-Coordenador do CEP/ACCG



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

(62) 3878-7000 | 3243-7000  
Rua 239, nº 206, St. Universitário  
Goiânia · Goiás · Brasil · CEP 74.605-070  
[www.accg.org.br](http://www.accg.org.br)

## **ANEXO 2**

---

## **DADOS COLETADOS PARA INSERÇÃO EM PLANILHA DE DADOS EXCEL**

1. NÚMERO DO CASO:
2. GÊNERO: ( ) 1. MASCULINO ( ) 2. FEMININO
3. DATA DO DIAGNÓSTICO:
4. IDADE AO DIAGNÓSTICO:
5. DATA DA CIRURGIA:
6. TOPOGRAFIA DO TUMOR:
7. TIPO DE CIRURGIA REALIZADA:
8. EXTENSÃO DO TUMOR:
9. TAMANHO DO TUMOR EM CM:
10. GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DO TUMOR:
11. QUANTIDADE DE LINFONODOS RETIRADOS À CIRURGIA:
12. METÁSTASES PARA OS LINFONODOS REGIONAIS:
13. METÁSTASES À DISTÂNCIA:
14. TRATAMENTO CLÍNICO: ( ) NÃO REALIZADO  
( ) ANTES DA CIRURGIA ( ) DEPOIS DA  
CIRURGIA  
( ) RADIOTERAPIA ( ) QUIMIOTERAPIA ( ) QT/RT QUIMIOTERÁPICOS:
15. ESTADIAMENTO PATOLÓGICO:
16. ESTADIAMENTO CLÍNICO:
17. ÓBITO: ( ) NÃO ( ) SIM DATA:
18. DATA DA ÚLTIMA CONSULTA:

## **ANEXO 3**

---

## **ANEXO 4**

---

Casos de adenocarcinoma colorretal e quantificação dos marcadores COX-2 e VEGF-C

Resultado: 1= Positivo; 2= Negativo

Biópsia	COX-2%	COX-2 Intensidade	COX-2 Resultado	VEGF-C%	VEGF-C Intensidade	VEGF-C Resultado (Soumaoro)	VEGF-C Resultado (Agaki)
2002-4195	4	3	1	3	2	1	1
1998-1751	4	3	1	3	1	1	2
1997-10386	4	2	1	4	2	1	1
1997-10498	4	2	1	0	0	2	2
2000-1441	4	3	1	2	2	1	1
1997-11045	4	2	1	3	2	1	1
1997-11192	4	3	1	4	2	1	1
1998-1849	3	2	1	0	0	2	2
1998-4662	4	2	1	3	2	1	1
1997-11467	4	2	1	0	0	2	2
1998-00877	4	2	1	2	2	1	1
1998-2898	4	2	1	0	0	2	2
1998-2451	4	2	1	0	0	2	2
1998-1607	4	2	1	4	2	1	1
1998-3268	4	3	1	3	2	1	1
1998-5200	4	2	1	0	0	2	2
1998-5199	4	3	1	2	2	1	1
1998-1884	4	3	1	2	2	1	1
1998-4146	3	2	1	1	2	1	1
1998-6941	4	2	1	2	2	1	1
1998-9640	2	2	1	2	2	1	1
1998-7846	3	3	1	1	2	1	1
1998-8008	3	3	1	4	3	1	1
1998-8002	3	2	1	2	2	1	1
1998-7999	4	3	1	1	2	1	2
1998-9805	3	2	1	0	0	1	2
1998-10844	4	2	1	2	2	1	1
1998-11982	4	3	1	1	2	1	1
1998-9639	4	2	1	3	2	1	1
1998-10108	3	2	1	3	2	1	1
1998-4534	3	2	1	0	0	2	2
1998-	3	2	1	2	2	1	1

10377							
1998-10700	4	3	1	3	2	1	1
2000-2021	4	2	1	3	2	1	1
1998-8624	4	3	1	3	2	1	1
1999-8902	3	2	1	0	0	2	2
1999-10791	3	2	1	1	2	1	2
1999-12816	4	3	1	1	2	1	1
1999-13108	2	2	1	0	0	2	2
1999-13331	4	3	1	2	2	1	1
1999-12679	3	2	1	0	0	2	2
2000-2506	3	2	1	0	0	2	2
2002-1869	3	2	1	0	0	2	2
2000-4908	4	2	1	2	2	1	1
2000-5490	3	2	1	0	0	2	2
2000-5915	3	2	1	0	0	2	2
2000-5086	4	3	1	0	0	2	2
20000-6403	4	3	1	1	1	2	2
2000-4445	3	2	1	1	1	2	2
2000-6250	4	3	1	2	2	1	1
2000-6373	4	3	1	4	1	1	1
2000-6783	4	3	1	3	2	1	1
2000-8512	4	3	1	2	2	1	1
2000-8343	4	3	1	2	2	1	1
2000-10788	4	3	1	4	2	1	1
2000-8696	4	2	1	1	2	1	1
2000-9292	4	2	1	3	1	1	2
2000-9765	4	2	1	2	1	1	2
2000-11883	4	3	1	2	1	1	2
2001-734	4	3	1	0	0	2	2
2000-13361	2	3	1	1	2	1	1
1998-11702	4	3	1	1	2	1	2
1998-11148	4	1	1	1	1	2	2
1998-11639	4	3	1	2	2	1	1
1998-11927	3	2	1	2	1	1	2

1999-200	4	2	1	2	1	1	2
1999-2534	4	3	1	4	3	1	1
1999-2857	2	2	1	1	2	1	1
1999-346	4	3	1	3	1	1	2
1999-739	4	2	1	4	2	1	1
1999-1227	4	3	1	3	2	1	1
1999-5510	3	3	1	3	2	1	1
1999-3826	4	2	1	1	1	2	2
1999-6031	4	2	1	2	0	2	2
1999-2609	4	2	1	0	0	2	2
1999-2731	4	3	1	2	1	1	2
1999-3307	4	3	1	2	2	1	1
1999-4256	4	3	1	3	2	1	1
1999-4460	4	2	1	4	2	1	1
1999-4663	4	3	1	4	1	1	2
1999-4344	3	3	1	1	2	1	1
1999-4257	4	3	1	3	1	1	2
1999-4845	3	2	1	2	2	1	1
1999-5509	4	2	1	1	2	1	1
1999-5651	4	2	1	2	1	1	2
1999-5374	4	2	1	2	1	1	2
1999-5508	4	2	1	1	1	2	2
1999-6650	4	2	1	2	2	1	1
1999-6597	3	2	1	2	2	1	1
1999-8162	3	2	1	0	0	2	2
1999-8030	3	2	1	1	1	2	2
1999-8807	4	2	1	2	2	1	1
2001-4394	4	1	1	3	2	1	1
1999-9267	3	2	1	2	1	1	2
1999-8208	4	2	1	0	0	2	2
2000-12794	3	2	1	30	1	2	2
2000-12389	4	2	1	0	0	2	2
2000-12865	4	2	1	0	0	2	2
2001-2545	4	3	1	3	2	1	1
2000-12945	4	2	1	0	0	2	2
2002-2364	4	3	1	3	1	2	2
2002-1190	4	0	1	0	0	2	2
2002-1139	4	2	1	4	2	1	1
2002-786	1	3	1	1	1	2	2
2002-1397	4	2	1	2	1	1	2
2002-5369	3	2	1	2	1	1	2
2002-450	4	3	1	3	2	1	1

2002-5419	4	2	1	3	2	1	1
2002-1186	4	2	1	3	2	1	1
2002-8931	3	2	1	0	0	2	2
2002-7983	3	1	1	2	2	1	1
2002-6315	4	2	1	0	0	2	2
2002-6167	1	2	1	1	1	2	1
2002-16709	4	2	1	1	1	2	1
2002-12551	4	2	1	2	2	1	1
2002-9641	4	2	1	0	0	2	2
2002-8123	0	0	2	0	0	2	2
2002-6965	2	2	1	0	0	2	2
2002-7984	3	2	1	0	0	2	2
2002-7851	3	2	1	2	2	1	1
2002-8292	3	2	1	2	2	1	1
2002-8845	4	2	1	2	2	1	1
2002-9155	4	2	1	1	2	1	1
2002-15181	0	0	1	2	2	1	1
2002-14909	3	2	1	2	2	1	1
2002-15114	4	2	1	0	0	2	2
2002-15019	3	2	1	0	0	2	2
2000-3219	3	2	1	0	0	2	2
2000-6783	2	3	1	3	3	1	1
98-10700	2	2	1	3	2	1	1
99-0200	3	2	1	3	2	1	1
2002-5312	3	3	1	2	3	1	1
2002-4662	4	2	1	2	3	1	1
2002-6167	3	3	1	2	2	1	1

## **ANEXO 4**

---

De: <jsr@stellarmed.com>

Data: 11 de março de 2012 19:47

Assunto: Submission Confirmation for Predominance of COX-2 over VEGF-C expression in colorectal adenocarcinoma among Brazilian patients

Para: apkipnis@gmail.com

Dear Dr Junqueira-Kipnis,

Your submission entitled "Predominance of COX-2 over VEGF-C expression in colorectal adenocarcinoma among Brazilian patients" has been received for consideration in the Journal of Surgical Research.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to EES (<http://ees.elsevier.com/jsurgres/>) as an author.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to the Journal of Surgical Research.

Kind regards,

Editorial Office  
Journal of Surgical Research

--

**Dr Ana Paula Junqueira Kipnis**  
**Laboratorio de Imunopatologia das Doenças Infecciosas**  
**IPTSP-UFG**

## **ANEXO 5**

---

## **Predominance of COX-2 over VEGF-C expression in colorectal adenocarcinoma among Brazilian patients**

Eliane Duarte Mota<sup>1\*</sup>, MD; Rita de Cássia Gonçalves Alencar<sup>1</sup>, MD; Adriano Augusto Pecat Paula<sup>1</sup>, PhD; Orlando Milhomen da Mota<sup>1</sup>;MD; Vera Aparecida Saddy, PhD; Junqueira-Kipnis, AP<sup>2\*</sup>, PhD.

1. The Association Against Cancer of Goiás.
2. Institute of Tropical Pathology and Public Health of The Universidade Federal de Goiás.

### **COX-2 and VEGF-C expression in colorectal cancer**

Subject category: Oncology

\*Corresponding authors addresses:

Eliane Duarte Mota

The Association Against Cancer of Goiás

Rua 239, n. 183, Setor Universitário

Goiânia-GO, Brazil, Zip Code: 74.605-070.

Fone/Fax: 55-62-32437032

Email: [mdelianemota@gmail.com](mailto:mdelianemota@gmail.com)

Ana Paula Junqueira-Kipnis

Institute of Tropical Pathology and Public Health

Rua 235 esquina com Primeira Avenida, Setor Universitário

Goiânia-GO, Brazil, Zip Code: 74.605-050.

Fone: 55-62-32096174

Email: [apkipnis@gmail.com](mailto:apkipnis@gmail.com)

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Colorectal adenocarcinoma (CRA) is a world wide distributed pathology, and lymph node metastasis is associated with a poor prognostic outcome. Angiogenesis and lymphangiogenesis are correlated with metastasis. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and Cyclooxygenase 2 (COX-2) are molecules directly involved in those processes. We investigated the possible association of the expression of VEGF-C and COX-2 with clinical/pathology features and five year survival rate.

**MATERIALS AND METHODS:** One hundred and thirty four cases of CRA from a Cancer Reference Hospital were randomly selected. The expression of VEGF-C and COX-2 was detected by immunohistochemistry and a univariate analysis was applied to evaluate the association between their expression and clinical stages, metastasis, and/or survival.

**RESULTS:** COX-2 expression was observed in 98.67% of the adenocarcinoma cases while VEGF-C was found in 54.48% of the cases. COX-2 was highly expressed by all clinical stages of CRA, but its expression was not associated with LN metastasis, tumor infiltration or five years survival. A correlation was observed between LN metastasis and VEGF-C positivity ( $p=0.02$ ) and clinical stages of the disease. The range of VEGF-C expressions was from 34.6% to 88.9% in stages 1 through 4, respectively.

**CONCLUSION:** The majority of the CRA cases were positive for COX-2. It was observed association between the expression of VEGF-C and LN metastasis as well as with clinical stages of the disease, although no association was found to the overall five year survival rate.

Key words: colorectal, cancer, VEGF-C, COX-2, adenocarcinoma, tumor.

## **Introduction**

Colorectal adenocarcinoma (CRA) is one of the main causes of cancer death worldwide including Brazil [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. The lymphatic system is the main route for malignant metastasis from gastrointestinal tumors. In addition, the commitment of regional lymph nodes is an important factor associated with poor patient prognostics [2, 3, 9, 10, 11, 12]. Lymphangiogenesis presents a relative new area of investigation where vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) is the most important known lymphangiogenic agent that promotes angiogenesis in several tumors including CRA [13, 14, 15, 16, 17, 18, 29, 30]. Nevertheless the significance of VEGF-C expression within CRA is not elucidated [13, 17]. Cyclooxygenase 2 (COX-2) is involved in tumorigenesis of CRA as well as in the induction of angiogenesis and lymphangiogenesis [10, 19, 20, 21, 22, 23, 29]. Also COX-2 is involved in the regulation of the expression of vascular endothelial growth factors, in particular VEGF-C [23, 24, 25, 26, 27, 28]. We investigated, by immunohistochemistry method, the possible association between the expression of COX-2 and VEGF-C with clinical/pathology findings and survival rate.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Patients***

This is a retrospective study. One hundred and thirty four patients that consecutively attended a Reference Center for Cancer (Hospital Araújo Jorge - Goiania, Goias, Brazil), diagnosed with CRA and surgically treated from 1997 until 2004 had their tissue samples histologically evaluated. The exclusion criteria were patients whose paraffined blocks were not found. The Ethical Committee of the Hospital do Cancer- Araújo Jorge approved this study.

### ***Immunohistochemistry***

Immunohistochemistry detection of VEGF-C and COX-2 on paraffin embedded tissues previously fixed with buffered formalin was performed by the streptavidin-peroxidase technique using Mach 4 Kit (Universal HRP-Polymer Kit-Biocard). Four  $\mu\text{m}$  thick slices affixed onto slides were deparaffinized with xylene and rehydrated with ethanol, endogenous peroxidase was blocked with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 20 minutes. Antigen retrieval was performed with heat by placing slides in a pressure cooker in citrate buffer for 10 min. Slides were then incubated with rabbit anti-VEGF-C polyclonal serum (Invitrogen, USA) diluted 1:400 or mouse anti-COX-2 monoclonal antibody (Invitrogen, USA) diluted 1:800. After incubation with secondary antibodies and horseradish peroxidase polymers, slides were stained with 3,3-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin. Two independent pathologists that were blinded to clinical/pathological data scored the stained slides. COX-2 positivity was defined by Soumaoro et al [29] methodology considering the percentage and intensity of stained cells. The percentage of tumor stained cells were scored from 0 to 4 (0 = 0%, 1 = 1 - 25%, 2 = 26 - 50%, 3 = 51 - 75% or 4 = 76 - 100%) and the intensity of staining varied from 1 to 3 (1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong). A positive score for COX-2 staining was considered when the sum of the scores was greater or equal to 3. Positivity for VEGF-C was defined by two different methods, Soumaoro et al [29] and Agaki et al [30]. According to Agaki et al., positive cases are those that present a moderate/intense staining in more than 10% of stained tumor cells. The Soumaoro methodology takes into account for positivity the percentage of stained cells as well as the intensity of staining. Percentage scores varies from 0 to 4 (0, if  $\leq 1\%$ ; 1, if  $> 1$  and  $\leq 20\%$ ; 2, if  $> 20$  e  $\leq 50\%$ ; 3, if  $> 50\%$  and  $\leq 80\%$  or 4, if  $> 80\%$ ), and intensity of scores

vary from 1 to 3 (1 = weak, 2 = moderate, 3 = intense). Positive staining for VEGF-C was considered when the final score was greater or equal to 5.

## **RESULTS**

### ***Patients' characteristics***

CRA from 134 patients were included in the study, and 77 patients (57.5%) were male. The mean age was 61.4 years, ranging between 25 and 87 years old. More than half of them (56.7%) presented metastasis to regional lymph nodes (LN). According to the clinical staging assessment, 26 (19.4%) individuals were on stage 1, 32 (23.9%) were on stage 2, 67 (50%) were on stage 3 and 9 patients were on stage 4 (Table 1). The global survival rate in five years analysis was 50% (Figure 1). Evaluating the possible associations with the survival of the patients, it was observed an inverse association with LN metastasis ( $p=0.003$ ) (Table 1). The survival rate for patients presenting LN metastasis was 38.2% and for patients without metastasis was 65.1%. Patients in stage 1 and 2 presented a survival rate superior to the survival rate of all patients diagnosed with CRA (65.4% and 65.6%, respectively). As expected patients in stage 3 presented a reduced survival rate (43.3%). None of the patients in stage 4 survived.

### **COX-2 expression within Colon Rectal Adenocarcinoma**

The majority (99.3%) of the histological samples from the patients were positive for COX-2. The cytoplasmic brownish coloration was presented in a high or mild intensity (Figure 2). Only one patient was classified as negative for the expression of COX-2. This fact contributed to the absence of possible associations with COX-2 expression (Table 2).

### **VEGF-C expression within Colon Rectal Adenocarcinoma**

Ninety individuals (67.2%) presented CRA positive for VEGF-C expression. In order to better characterize the VEGF-C expression, two systems to classify the patients as positive or negative were used. Using Soumaoro et al. [29] methodology, no clinical and histological associations were found associated to the expression of VEGF-C (Table 3). According to Agaki et al. [30] methodology, a tendency of higher frequency of individuals younger than 65 years old, presenting CRA expressing VEGF-C ( $p=0.06$ ), was observed. A strong correlation was observed between LN metastasis and VEGF-C positivity ( $p=0.02$ ). As the tumor progresses to poorer clinical stages, a higher percentage of VEGF-C expression was found, ranging from 34.6% to 88.9% in stages 1 and 4, respectively (Table 4).

### **DISCUSSION**

This is the first study among Brazilian patients focusing on the involvement of COX-2 and VEGF-C expression in CRA. The reference hospital where this study was conducted, is a center for cancer treatment that receives patients from the entire Central-west regions of Brazil including the states of Goias, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Tocantins. The majority of patients with CRA attending the hospital presented advanced clinical stages of the disease (stages 3 and 4 accounted for 56.7% of the cases), a circumstance probably related to the asymptomatic characteristic of this illness in its early stages. One additional reason could be the fact that the hospital is a philanthropic health care provider where most of the patients seeking for

attention have low income and consequently do not seek the health system until the disease becomes more complicated or evident.

The lymphatic system is the main mechanisms for the dissemination of CRAs and gastrointestinal tumors in general [9, 2, 3]. COX-2 is considered a lymphangiogenesis promoting factor as it up-regulates the expression of VEGF-C [22], which in turn is one of the most important known lymphangiogenic factor [13].

The immunohistochemistry method is a useful tool to detect tumor biological markers, widely used, with a relative simple methodology and with a more accessible cost than other sophisticated techniques. In our study we observed association between the expression of VEGF-C and LN metastasis as well as with clinical stages of the disease. The methodology of tumor scoring according to Agaki et al. [30] has proven in our studied group of more utility, as it made possible to discriminate the expression of VEGF-C among different characteristics of the disease.

Although VEGF-C has been shown to be inversely associated to the overall survival rate [18, 29, 30] in this study the expression of this molecule was not associated to the patients' prognostic [data not shown], nevertheless the clinical stages of the disease was directly associated to the VEGF-C expression. This lack of association with the clinical outcome may be due to the low number of patients studied here.

COX-2 expression was elevated in all but one of the studied cases, and consequently no correlation could be found between its expression and clinical, pathological or survival data (Table 2). The COX-2 higher expression in CRA favors the role of this molecule directly to the tumorigenesis described also by others authors [19, 23].

Because COX-2 was expressed in all CRA analyzed, practically all tumor samples that were VEGF-C positive were also positive for COX-2, thus the co-expression of those markers can not be used as a marker of the disease progression or the overall five year survival rate. This work intended to analyze the usefulness of employing both markers together in the assistance for the medical decision on prophylactic chemotherapy of the CRA patients. In our opinion, the strongest contribution of our study was to reinforce the participation of COX-2 in the development of CRA, and the importance of the treatment/prophylaxis with COX-2 inhibitors.

## **CONCLUSION**

The majority of the CRA cases were positive for COX-2. It was observed association between the expression of VEGF-C and LN metastasis as well as with clinical stages of the disease, although no association was found to the overall five year survival rate

## **Acknowledgments**

The authors thanks to the doctors: Paulo Moacir de Oliveira Campoli, Daniela Medeiros Milhomen Cardoso, Élbio Cândido de Paula, Jales Benevides Santana Filho from the Hospital Araújo Jorge for the colonoscopy. The authors were thankful to André Kipnis from Universidade Federal de Goiás for careful proofreading of the manuscript.

## REFERENCES

1. Jemal A, Ward E, Thun M. Declining Death Rates Reflect Progress against Cancer. PLoS ONE [serial on the Internet]. 2010 Mar [cited 2010 Mar 9]; 5(3): [about 10 p.]. Available from: [http://www.PLoS ONE 5\(3\): e9584](http://www.PLoS ONE 5(3): e9584). doi:10.1371/journal.pone.0009584.
2. Robbins and Cotran 2010. *Pathologic Basis of Disease*. 8th edition, Kumar et al. Elsevier, 1450 pp.
3. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND 2010. In *WHO classification of the Tumours of The Digestive Sistem*. IARC, Lyon, pp 132-51.
4. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, 2011, 118 p. [database on Internet] [access in 2012 Jan 09]. Access: <http://www.inca.gov.br>
5. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG 2005. Colon Cancer Survival Is Associated With Decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol 34*: 8706-12.
6. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG 2003. Colon Cancer Survival Is Associated With Increasing Number of Lymph Nodes Analyzed: A Secondary Survey of Intergroup Trial INT-0089. *J Clin Oncol 21*(15): 2912-9.
7. Karnes-Jr WE 2000. Implications of Low COX-2 Expression in Colorectal Neoplasms With Defective DNA Mismatch Repair. *Journal of Cellular Biochemistry 34*: 23-27.
8. Perea J, Lomas M, Hidalgo M 2011. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev esp Enferm Dig 103*(1): 29-35.
9. Jia YT, ZX, He YT, Liang W, Yang HC, Ma HJ 2004. Expression of vascular endothelial growth factor-C and the relationship between lymphangiogenesis

and lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 10(22):3261-3.

10. Sheehan, KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray F 1999. The Relationship Between Cyclooxygenase-2 Expression and Colorectal Cancer. *JAMA* 282(13): 1254-7.

11. Leslie A, Steele RJ 2002. Management of colorectal cancer. *Postgrad Med J* 78(922):473-8.

12. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134(5):1296-310.

13. Inda AM, García MN, Andrini LB, Garcia AL, Blanco AF, Furnus CC, Galletti SM, Brandoni J, Martinez JG, Prat GD, Errecalde AL 2009. Evaluation of Angiogenesis with the Expression of VEGF-C and CD34 in Human Colon Cancer. *Current Chemical Biology* 3: 302-305.

14. Xu T, Chen D, Chen J 2004. Expression of vascular endothelial growth factor C and its correlation with lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Med Sci* 24(6):596-8.

15. George ML, Tutton MG, Janseen F, Arnaout A, Abulatfi AM, Eccles SA, Swift IR 2001. VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D in colorectal cancer Progression. *Neoplasia* 3(5): 420-427.

16. Nakamoto RH, Uetake H, Iida S, Kolev YV, Soumaoro YT, Yasuno M and Suguhara K 2007. Correlations between Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenic Factors in Primary Tumours and Liver Metastases in Colorectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 37(9) 679-685.

17. Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H. Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 38: 540-4.

18. Pierobon M, Calvert V, Belluco C, Garaci E, Deng J, Lise M, Nitti D, Mammano E, De Marchi F, Liotta L, Petricoin E 2009. Multiplexed cell signaling analysis of metastatic and non metastatic colorectal cancer reveals COX2-EGFR signaling activation as a potential prognostic pathway biomarker. *Clin Colorectal Cancer* 8(2):110-7.
19. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmol HJ 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 411-417.
20. Fosslien E 2000. Biochemistry of cyclooxygenase (COX-2) inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37(5): 431-502.
21. Brambilla E, Moreira LF, Serafini EP 2007. Avaliação Imunoistoquímica da Proteína Ciclooxygenase-2 nas Neoplasias Colorretais e sua Relação com Fatores Patológicos Prognósticos. *Rev bras Coloproct* 27: 256-263.
22. Gou HF, Chen XC, Zhu J, Jiang M, Yand Y, Cao D, Hou M. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer: correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*[Serial on the internet]. 2011. 30:14 [About 8 p.]. Available from: <http://www.jeccr.com.content/30/1/14>
23. Rizzo MT 2011. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica Chimica Acta* 412: 671-687.
24. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ 1999. Tromboxane A2 Is a Mediator of Cyclooxygenase-2-dependent Endothelial Migration and Angiogenesis. *Cancer Res* 59: 4579-4577.
25. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Eksler BB and Subbaramaiah K 2001. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2: 544-51.

26. Fux R, Schwab M, Thon KP, Gleiter CH, Fritz P 2005. Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clin Cancer Res* 11(13): 4754-60.
27. Castells A, Payá A, Alenda C, Rodríguez-Moranta F, Agrelo R, Andreu M, Piñol V, Castellví-Bel S, Jover R, Llor X, Pons E, Elizalde JI, Bessa X, Alcedo J, Saló J, Medina E, Naranjo A, Esteller M, Piqué JM 2006. Cyclooxygenase2 expression in colorectal cancer with DNA mismatch repair deficiency. *Clin Cancer Res* 12(6):1686-92.
28. Bernardeau-Mozer M, Chaussade S 2004. Cyclooxygenase2 inhibitors and colorectal cancer. *Bull Cancer* 1: 91 Suppl 2: S89-98.
29. Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y, Iida S, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K 2006. Coexpression of VEGF-C and COX-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 49(3):392-8.
30. Agaki K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, Sugimachi K 2000. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *BJC* 83(7): 887-891.