

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia e Ciências Aplicadas à

Gastroenterologia

FATOR DE VON WILLEBRAND  
NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL

Dissertação de mestrado

Autor: DANIEL DE CARVALHO DAMIN

Orientador: PROF. GILBERTO SCHWARTSMANN

PORTO ALEGRE

2000

**D159f** Damim, Daniel de Carvalho

Fator de von Willebrand no adenocarcinoma colorretal/ Daniel de  
Carvalho Damim; orient. Gilberto Schwartzmann – Porto Alegre, 2000.  
64 F.:iL

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina :  
Gastroenterologia.

1. Fator de von Willebrand. 2. Adenocarcinoma. 3. Neoplasias  
colorretais. I. Schwartzmann, Gilberto II. Título

NLM: WI529

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do  
título de Mestre em Medicina:  
Gastroenterologia*

*À minha esposa Andréa*

*Aos meus pais, Elizabeth e Décio Damin*

*“O único homem que nunca erra é aquele que nada faz.”*

*F.D. Roosevelt*

*“Os barcos estão seguros se permanecerem no porto, mas eles não foram feitos para isso.”*

*Autor desconhecido*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste estudo contou com a participação de muitas pessoas. Para algumas expresso aqui meu agradecimento mais sincero.

Ao amigo e Prof. GILBERTO SCHWARTSMANN pela constante e qualificada orientação demonstrada em todos os momentos do projeto. Sua atitude científica empreendedora representa uma meta a ser atingida por qualquer pesquisador.

Ao Prof. PEDRO GUS, pela amizade sempre presente, pelo apoio e oportunidade para realização deste estudo proporcionada pelo Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Prof. MÁRIO ANTONELLO ROSITO, que representa um exemplo para seus alunos e residentes. O privilégio do convívio diário com o Prof. ROSITO nos ensina não somente a prática da Coloproctologia, mas principalmente o que significa ser médico.

Ao Prof. ISRAEL ROISEMBERG que, incondicionalmente, colocou à disposição deste projeto sua experiência e os recursos técnicos fundamentais para realização do mesmo.

À Profa. ELIANE BANDINELLI pela amizade desenvolvida, pela inteligência sempre demonstrada e pela dedicação a este projeto. A participação da Profa. ELIANE foi essencial para a concretização deste estudo.

Ao Curso de Pós-graduação em Gastroenterologia da UFRGS, representado pelo Prof. SÉRGIO BARROS, pela oportunidade e apoio, além da condução de um programa com os mais elevados padrões científicos.

Ao Dr. CLÁUDIO TARTA pelo estímulo constante e sugestões para análise do dados.

Ao Dr. MARCOS WEINDORFER, colega e amigo, que acompanhou todas as etapas deste projeto, demonstrando sempre seu apoio e colaboração.

Ao Dr. GERALDO CARON ANGELI e ao Dr. GUILHERME R. SIEPE pelo apoio e amizade sempre presentes.

A secretária Patrícia Soares Ribeiro, do Curso de Pós-graduação em Gastroenterologia, pela disposição e eficiência.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro ao estudo.

## SUMÁRIO

<b>Lista de tabelas</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>X</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>24</b>
3.1 Delineamento do estudo	24
3.2 População estudada	24
3.3 Amostra estudada	26
3.4 Metodologia	27
3.5 Avaliação clínico-patológica	30
3.6 Análise estatística	31
3.7 Ética	32
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Características genéricas da amostra</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Níveis plasmáticos do FvW</b>	<b>35</b>
<b>4.3 FvW e estadiamento tumoral</b>	<b>36</b>
<b>4.4 FvW e tamanho tumoral</b>	<b>38</b>
<b>4.5 FvW e invasão tumoral de órgãos adjacentes</b>	<b>39</b>

	<b>4.6 FvW e metástases á distância</b>	<b>40</b>
	<b>4.7 FvW e CEA; FvW e diferenciação histológica</b>	
<b>41</b>		
	<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
	<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>51</b>
	<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>52</b>
	<b>8. SUMMARY</b>	<b>54</b>
	<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01 – Estadiamento de Dukes modificado por Turnbull</b>	<b>31</b>
<b>TABELA 02 – Características genéricas</b>	<b>33</b>
<b>TABELA 03 - Localização tumoral</b>	<b>34</b>
<b>TABELA 04 – Procedimentos cirúrgicos</b>	<b>34</b>
<b>TABELA 05 – Estadiamento tumoral</b>	<b>35</b>
<b>TABELA 06 – Níveis plasmáticos do FvW e desvio padrão por estadiamento</b>	<b>37</b>
<b>TABELA 07 – Níveis do FvW por estadiamento após ajuste pela Idade</b>	<b>38</b>
<b>TABELA 08 – Invasão de órgãos adjacentes</b>	<b>39</b>
<b>TABELA 09 – Localização das metástases</b>	<b>40</b>
<b>TABELA 10 – Diferenciação histológica dos tumores</b>	<b>41</b>
<b>TABELA 11 – Distribuição dos tumores mucinosos ou pouco diferenciados por estágios</b>	<b>42</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01 – Etapas envolvidas na disseminação tumoral</b>	<b>4</b>
<b>FIGURA 02 – Cascata da coagulação</b>	<b>8</b>
<b>FIGURA 03 – Patogênese da formação de metástases</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 04 – Lâmina de vidro com complexos antígeno-anticorpo formando as figuras em “fogete”</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 05 – Representação gráfica dos níveis do FvW com o estadiamento tumoral</b>	<b>37</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEA = antígeno carcinoembriônico

DNA = ácido desoxirribonucleico

FvW = fator de von Willebrand

FvWAg = antígeno do fator de von Willebrand

GpIa = glicoproteína Ia

GpIIb = glicoproteína IIb

GpIIIa = glicoproteína IIIa

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

KTTP = tempo parcial de tromboplastina

mg/ml = miligramas por mililitro

ng/ml = nanogramas por mililitro

PCR = reação em cadeia da polimerase

RNA = ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> = ácido ribonucleico mensageiro

TP = tempo de protrombina

U/dL = unidades por decilitro

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## RESUMO

O adenocarcinoma colorretal é um dos tumores sólidos mais prevalentes no mundo, ocupando a terceira posição em ambos os sexos, precedido pelo carcinoma de pulmão e estômago em homens, e pelo carcinoma de mama e cérvix em mulheres. No Brasil, o adenocarcinoma colorretal está entre as cinco neoplasias mais freqüentes, ocupando a quinta posição em mortalidade. A sobrevida global dos pacientes está em torno de 40% em 5 anos, tendo havido pequena elevação deste índice nas últimas quatro décadas.

O estadiamento clínico-patológico permanece como o mais importante indicador prognóstico para o adenocarcinoma colorretal, sendo a sobrevida em 5 anos dos pacientes portadores de metástases à distância menor que 5%. Estas lesões são encontradas em 75% dos indivíduos que morrem da doença e representam, na maioria das vezes, um evento terminal.

**O processo de metastatização segue uma série de etapas interligadas que devem ser completadas pela célula tumoral para que se produza uma lesão clinicamente evidente. O primeiro passo desta seqüência se dá através de um fenômeno conhecido como angiogênese. Este consiste na proliferação**

endotelial acelerada com formação de novos vasos, que irão permitir que o tumor cresça e envie células neoplásicas à circulação.

Esta neovascularização leva à maior produção de uma glicoproteína plasmática essencial para o processo de hemostasia primária, o fator de von Willebrand. Esta proteína é liberada pelas células endoteliais e pelas plaquetas e seus níveis estão elevados em situações clínicas em que há proliferação ou dano endotelial.

Nos pacientes com câncer, o fator de von Willebrand, além de servir como potencial marcador da angiogênese, contribui diretamente para a formação das metástases, promovendo a ligação das células tumorais às plaquetas. Esta interação faz com que se formem agregados celulares heterotípicos que não são reconhecidos pelo sistema imunológico e têm maior capacidade de adesão aos leitos capilares dos órgãos alcançados.

A associação entre aumento nos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand e a progressão neoplásica foi demonstrada em pacientes com tumores de cabeça e pescoço e colo uterino, não havendo dados na literatura sobre a correlação deste fator com o câncer colorretal. No presente estudo foram comparados as concentrações desta proteína em 75 pacientes com adenocarcinoma colorretal e em 88 controles saudáveis, sendo estes valores correlacionados com os principais indicadores prognósticos da doença. Este é o primeiro estudo a ser publicado que documenta o comportamento do fator de von Willebrand em pacientes com adenocarcinoma colorretal.

Os resultados deste estudo demonstraram que os pacientes com câncer colorretal apresentaram níveis de fator de von Willebrand significativamente superiores aos controles ( $P < 0.0001$ ). Houve associação significativa entre as concentrações do fator de von Willebrand e o estadiamento tumoral ( $P < 0.0001$ ), a invasão de estruturas anatómicas adjacentes ( $P < 0.009$ ) e a presença de metástases à distância ( $P < 0.02$ ).

Os dados aqui apresentados sugerem que os níveis plasmáticos do fator de von Willebrand nos pacientes com adenocarcinoma colorretal possam ser indicadores do comportamento biológico deste tumor. Portanto, a definição do papel desta proteína no processo de disseminação neoplásica merece estudos complementares.

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal é um dos tumores sólidos mais prevalentes no mundo, ocupando a terceira posição, em ambos os sexos, precedido pelos carcinomas de pulmão e estômago em homens, e pelos carcinomas de mama e cérvix em mulheres <sup>1</sup>. Nos Estados Unidos, ocupa a quarta posição em incidência, após os carcinomas de mama, pulmão e próstata, e representa a segunda causa de morte por câncer, atrás do carcinoma de pulmão <sup>2</sup>. Neste país, em 1996, ocorreram cerca de 134.000 novos casos de carcinoma colorretal e 55.000 mortes pela doença <sup>3</sup>.

Conforme dados do Ministério da Saúde e Instituto Nacional do Câncer, estimou-se no Brasil, a ocorrência de 9.200 novos casos de câncer colorretal em homens e 9.850 em mulheres, em 1999, com uma taxa bruta de incidência por 100.000 habitantes de 11,66 e 12,54 respectivamente, estando entre as cinco neoplasias mais incidentes em ambos os sexos. Em relação a taxa bruta de mortalidade por câncer por 100.000 habitantes o câncer colorretal ocupa a quinta posição, tendo apresentado um aumento progressivo na mortalidade proporcional entre os óbitos registrados no Brasil entre 1980 e 1996 <sup>4</sup>.

Aproximadamente noventa e cinco por cento dos tumores malignos colorretais são adenocarcinomas. A etiologia da doença ainda é desconhecida, embora fatores genéticos e ambientais estejam implicados <sup>5</sup>. A sobrevida global dos pacientes está em torno de 40% . Apesar do aprimoramento dos métodos

diagnósticos, técnica cirúrgica e tratamento adjuvante, este índice teve um aumento discreto nas últimas quatro décadas, visto que a sobrevida em cinco anos era de 32% para o carcinoma de colon e de 29% para o carcinoma de reto no período de 1940 a 1949, nos Estados Unidos <sup>6</sup>.

Dentre os inúmeros fatores prognósticos estudados, a diferenciação histológica, a profundidade de invasão na parede intestinal e a invasão linfática são os mais bem definidos <sup>7, 8, 9, 10</sup>. O comprometimento de linfonodos, bem como número de gânglios envolvidos também são considerados indicadores prognósticos independentes <sup>8, 11</sup>.

O tratamento de eleição para o carcinoma colorretal é cirúrgico e se baseia na remoção tumoral em bloco incluindo linfonodos regionais, que pode ser ampliada para ressecção de órgãos adjacentes se estes estiverem invadidos <sup>12</sup>. Aproximadamente 75% dos pacientes apresentam tumores que permitem a remoção completa <sup>13</sup>. Apesar deste elevado índice de ressecabilidade e do fato da disseminação se dar primariamente para os linfonodos regionais, 25% dos pacientes apresentam metástases hepáticas sincrônicas por ocasião do diagnóstico e 50% desenvolvem metástases metacrônicas, vindo a morrer em consequência destas <sup>14, 15</sup>.

O desenvolvimento de metástases à distância representa um evento terminal para a maioria dos pacientes, sendo estas lesões encontradas em 75% dos indivíduos que morrem da doença. A sobrevida em 5 anos para pacientes com metástases é de menos de 5% <sup>16</sup>. Os órgãos mais freqüentemente envolvidos

são o fígado (75%), pulmões (15%), ossos (5%) e cérebro (5%). A recidiva local tem também importância como causa de falha terapêutica <sup>17</sup>.

Neste contexto, fica clara a importância do estudo dos diversos fatores que possam ter influência no processo de metastatização do carcinoma colorretal. Este processo segue uma série de etapas interligadas que devem ser completadas pela célula metastática para que se produza uma lesão clinicamente evidente (figura 1). O primeiro passo desta seqüência se dá através de um fenômeno conhecido como angiogênese <sup>14, 18</sup>.

A angiogênese foi estudada com profundidade por Folkman que demonstrou que a maioria dos tumores, em humanos, permanece *in situ* por meses a anos, recebendo oxigênio e nutrientes por difusão no espaço extracelular. Nesta fase, chamada de pré vascular, raramente o tumor é maior que 2 a 3 mm<sup>3</sup>, existindo um equilíbrio entre a velocidade de proliferação e de morte das células. Em determinado momento, uma subpopulação de células no tumor passa a expressar um fenótipo angiogênico, ou seja, inicia a produção de proteínas que estimulam a proliferação de microvasos a partir das células endoteliais do hospedeiro.

Até o presente momento, há doze proteínas angiogênicas identificadas, sendo o fator básico de crescimento fibroblástico e o fator de crescimento do endotélio vascular as mais comumente encontradas. Adicionalmente, para que o crescimento vascular ocorra, é necessário que haja a supressão da atividade de proteínas inibidoras da angiogênese que normalmente protegem o endotélio

vascular do estímulo mitogênico, tais como o fator plaquetário 4, angiostatina, prolactina, trombospodina-1, interferon alfa e inibidores teciduais das metaloproteinases. A perda do gene supressor p53 está associada com a mudança das células para o fenótipo angiogênico e com a redução na expressão da proteína inibidora trombospodina-1 <sup>16, 19, 20</sup>.

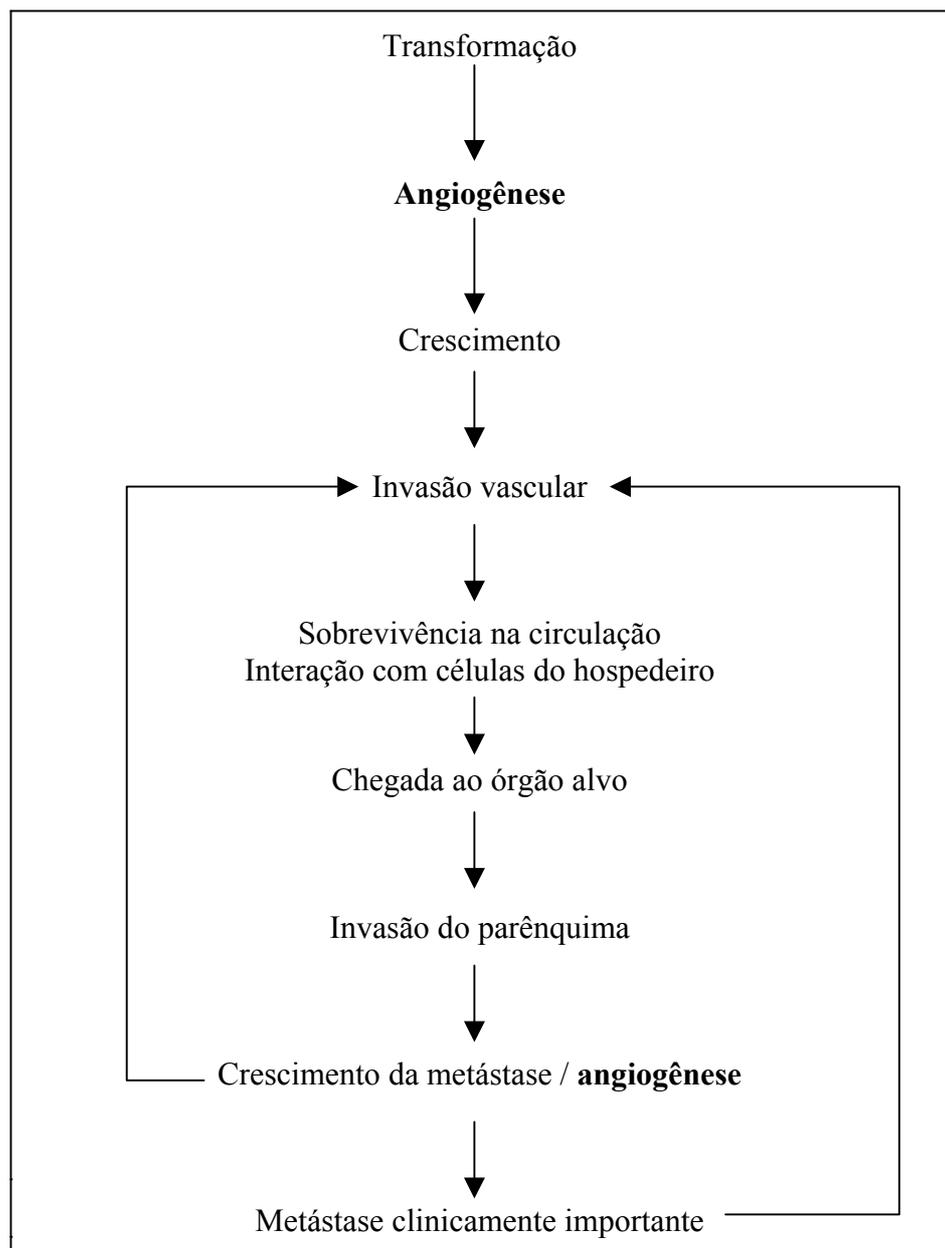


FIGURA 01 – Etapas envolvidas na disseminação tumoral. Adaptado de Hart e Saini, 1992 <sup>18</sup>.

Estima-se que existam mais de  $10^{15}$  células endoteliais cobrindo uma área de  $1000 \text{ m}^2$  em um homem de 70 kg. O tempo de renovação destas células, normalmente quiescentes, ultrapassa 1000 dias. Durante o processo de angiogênese, no entanto, as células endoteliais capilares podem proliferar-se tão rapidamente quanto as células da medula óssea, reduzindo seu tempo de renovação para aproximadamente 5 dias<sup>19,20</sup>.

Do ponto de vista clínico, a angiogênese permite que o tumor cresça e metastatize. A maioria das lesões não se torna sintomática e tecnicamente detectável até que o processo se inicie<sup>20</sup>. A entrada de células neoplásicas na circulação somente começará a ocorrer após a neovascularização do tumor primário<sup>21</sup>. Diversos estudos demonstraram que há correlação entre os índices de angiogênese, determinados pela contagem de microvasos por campo de microscopia, e a sobrevida dos pacientes com carcinoma colorretal<sup>9,22</sup>. Tumores de colon com metástases linfáticas, peritoneais ou hematogênicas apresentam número superior de vasos por campo em comparação aos tumores não metastáticos<sup>23</sup>.

Existem indícios que o processo de angiogênese determine um aumento nos níveis plasmáticos de uma glicoproteína fundamental para que a coagulação sanguínea possa ocorrer, o fator de von Willebrand (FvW)<sup>24, 25, 26</sup>. Esta proteína é sintetizada nas células endoteliais e nos megacariócitos como um polipeptídeo precursor. Após complexas reações intracelulares de polimerização, é armazenada sob a forma de multímeros de alto peso molecular em organelas específicas, de onde será liberada conforme estímulos. Estas organelas são os

corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais e os alfa grânulos nos megacariócitos e nas plaquetas. Uma parte do FvW produzido nas células endoteliais, no entanto, é constantemente secretada de forma a garantir a manutenção de um *pool* circulante no plasma<sup>27, 28, 29</sup>.

A função primordial do FvW é regular o mecanismo de hemostasia primária, que se constitui na resposta fisiológica inicial às alterações da integridade vascular. Uma vez lesadas as células endoteliais, há uma vasoconstricção reflexa com redução do fluxo sanguíneo e exposição da matriz subendotelial rica em colágeno. O FvW solúvel no plasma entra então em contato com o colágeno no sítio lesado, ligando-se fortemente a este. Tal interação promove uma alteração ultraestrutural no FvW que passa a expor múltiplos sítios intrínsecos (domínios A1) com capacidade de ligação específica com a glicoproteína Ib (GpIb), presente na membrana celular das plaquetas. Desta forma, o FvW age como uma ponte, através da qual se dará a adesão das plaquetas à matriz subendotelial<sup>30, 31</sup>.

Depois de aderidas, as plaquetas passam ao estado ativado, que se caracteriza pela alteração de sua forma celular e secreção do conteúdo dos alfa grânulos. São liberadas as reservas intracelulares do FvW, sob a forma de multímeros com maior peso molecular e com capacidade superior de ligação. As plaquetas ativadas passam a expressar o complexo de glicoproteínas IIb e IIIa (GpIIb e GpIIIa) que representam os receptores de membrana para o FvW nesta etapa. Deste modo, o FvW atuará também como mediador da ligação entre as próprias plaquetas (agregação), que resultará na subsequente deposição de um

número maior destas células no sítio de lesão, desencadeando assim a formação do trombo<sup>30, 31</sup>.

A degranulação das plaquetas libera, juntamente com o FvW, uma série de substâncias biologicamente ativas, sendo de particular importância a adenosina difosfato e o ácido araquidônico, que posteriormente gerará o tromboxano A<sub>2</sub>. Estas substâncias agirão sinergicamente iniciando uma série de eventos em cadeia, que resultarão na formação de uma rede de fibrina, gerada pela ação da trombina, como subproduto das vias de coagulação extríntrica e intríntrica.

A cascata de coagulação é complexa, envolvendo múltiplas reações enzimáticas proteolíticas, cujos produtos podem exercer uma retroalimentação positiva ou negativa. A ausência de enzimas proteolíticas ou de seus inibidores pode desviar o equilíbrio das reações no sentido dos distúrbios hemorrágicos ou trombóticos. A coagulação pode ser desencadeada pela exposição do sangue a fatores teciduais quando há lesão endotelial (via extríntrica) ou pela ativação de fatores de contato presentes no plasma (via intríntrica). As duas vias terão como resultado final a produção de trombina. A presença de co-fatores como o fator Va e VIIIa e o fator tecidual, as superfícies fosfolipídicas e o cálcio é indispensável para que haja ativação eficiente da cascata (figura 2)<sup>32,33</sup>.

### Seqüência Intrínscica

Fator XII  
Cininogênio de APM  
Pré-caliceína

Seqüência

Extrínscica

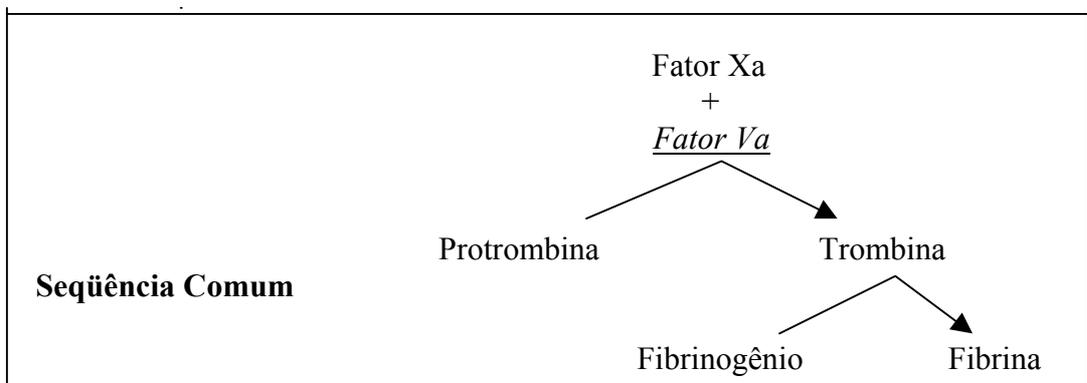
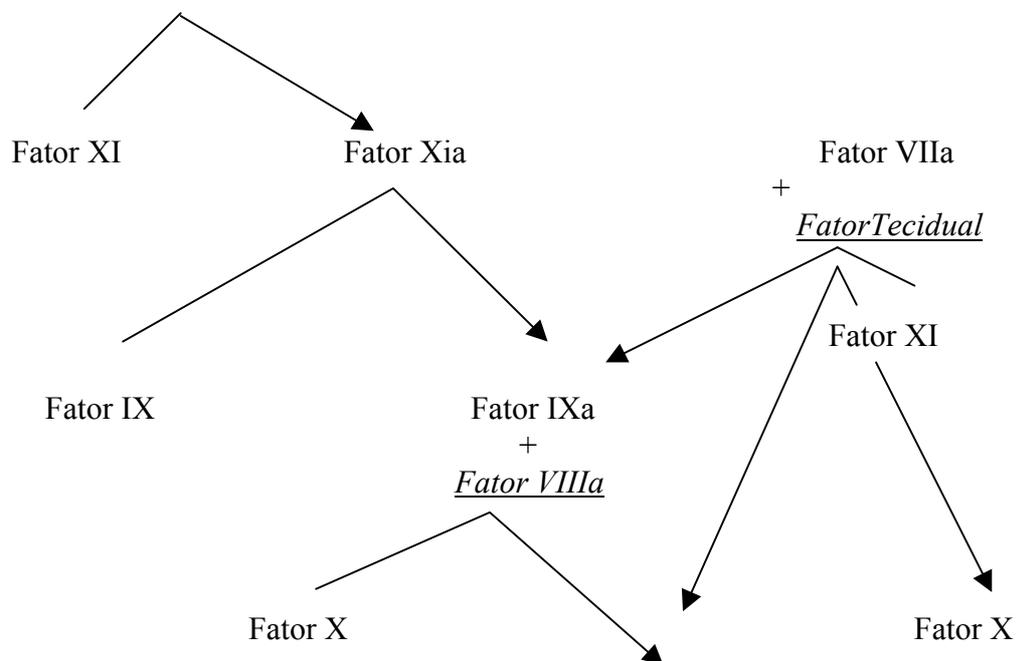


FIGURA 2 - Cascata da coagulação. Os zimogênios plasmáticos (formas inativas) são convertidos a proteases ativas conforme indicam as setas. Os cofatores não enzimáticos indispensáveis encontram-se sublinhados. Os fatores IX e X são ativados nas superfícies fosfolipídicas. A trombina quebra o fibrinogênio, produzindo fibrina que, após polimerização, forma o coágulo. (APM = alto peso molecular). (adaptado de Ewald)<sup>32</sup>.

Além de seu papel na regulação da hemostasia primária, O FvW tem também a função de proteína carreadora do fator VIII da coagulação, protegendo-o contra a degradação pela proteína C ativada no plasma <sup>32, 33</sup>. Defeitos qualitativos ou quantitativos do FvW resultam em complicações hemorrágicas conhecidas como doença de von Willebrand. Esta se caracteriza por tempo de sangramento prolongado, não acompanhado de diminuição da agregação plaquetária. Trata-se de um distúrbio hereditário, autossômico, estando o gene para o FvW localizado no cromossoma 12 <sup>33,34</sup>.

Níveis aumentados do FvW foram observados em diversas condições clínicas em que existe proliferação ou dano endotelial (reatividade de fase aguda). São exemplos a diabetes mellitus, infecções agudas, vasculites, infarto agudo do miocárdio e doença hepática <sup>35, 36, 37, 38, 39, 40, 41</sup>. Sabe-se também, que o grupo sanguíneo tem influência nas dosagens plasmáticas do FvW, sendo estas inferiores em indivíduos do grupo O <sup>42</sup>.

Hodak e colaboradores, ao estudarem o sarcoma de Kaposi, neoplasia que tem origem no endotélio vascular, verificaram que estes pacientes apresentavam níveis de FvW significativamente elevados quando comparados a controles ( $n = 29$ ,  $P < 0.01$ ). Pacientes com doença ativa tinham níveis elevados em comparação àqueles em remissão ( $P < 0.05$ ), evidenciando que o FvW pode ser usado como marcador da atividade da doença <sup>25</sup>.

Em um estudo de 51 pacientes com diversos tipos de tumores malignos submetidos à radioterapia, foram observados níveis significativamente

aumentados do FvW em relação a controles antes do início do tratamento ( $P < 0.01$ ) . Após a radioterapia houve queda destes índices, levando os autores a concluir que a redução do número de células endoteliais pela radiação diminui a produção e a liberação do FvW no plasma <sup>26</sup>.

Através da microscopia imunoeletrônica para o FvW se estudou a microvasculatura do estroma de carcinomas gástricos. Nos tumores com diferenciação histológica do tipo intestinal (9 casos) verificou-se uma maior concentração do FvW na periferia do estroma e nas células endoteliais. Estas células apresentavam uma alteração ultraestrutural caracterizada pelo aumento na quantidade de retículo endoplasmático rugoso, onde se localizava, assim como nos corpos de Weibel-Palade, a maior concentração do FvW. Tal padrão servia para evidenciar uma mudança das células endoteliais para um estado de produção protéica ativa. Os resultados obtidos com tumores indiferenciados (12 casos) foram, no entanto, menos expressivos <sup>43</sup>.

Em um modelo experimental, células endoteliais de veia umbilical humana foram encubadas por dezoito horas na presença ou na ausência de concentrações aumentadas do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator de crescimento fibroblástico-2. Em seguida foi quantificado o RNAm para o FvW através da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* de DNA específicos para FvW humano. Houve um aumento significativo de várias vezes, em relação aos controles ( $P < 0.05$ ), das dosagens de RNAm para o FvW com a utilização dos fatores de crescimento. Desta forma demonstrou-se que a resposta das células endoteliais aos agentes indutores da angiogênese inclui um

aumento dos níveis de RNAm para o FvW e que sua determinação em um tumor pode ser usada como método para a quantificação da angiogênese <sup>44</sup>.

O papel do FvW, entretanto, não é apenas o de marcador indireto da neovascularização tumoral. Evidências indicam que esta proteína possa desempenhar uma papel crítico para que o processo de metastatização efetivamente ocorra. Sabe-se que a simples presença de células tumorais na circulação não assegura o surgimento de uma lesão metastática. A maior parte destas células se destrói rapidamente em consequência de defeitos estruturais intrínsecos dos processos enzimáticos, ou por problemas mecânicos como o turbilhonamento da corrente sanguínea. Outras tantas são identificadas e eliminadas pela ação do sistema imunológico <sup>13</sup>.

Através de um modelo animal, com células de melanoma murino B16 radiomarcadas com <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridina, demonstrou-se que, após 24 horas da injeção na circulação, menos de 1 % das células tumorais continuavam viáveis e menos de 0.1 % eventualmente produziam metástases <sup>45</sup>. A sobrevivência das células neoplásicas na circulação e a probabilidade de originarem lesões metastáticas dependem da sua capacidade de interação com as células do hospedeiro, em particular com as plaquetas (figura 3).

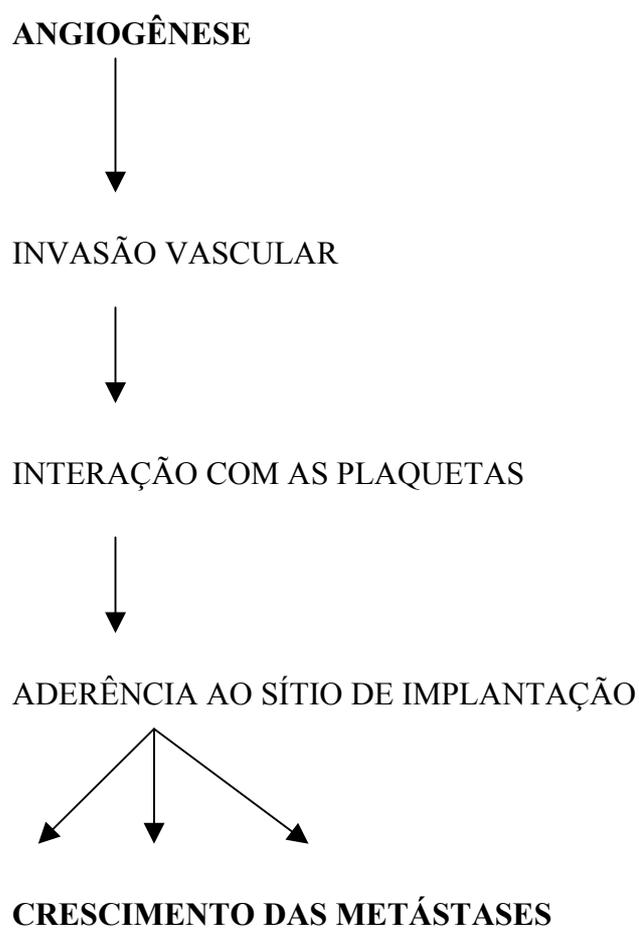


FIGURA 03 - Patogênese da formação de metástases. São demonstradas as várias etapas interligadas. A célula tumoral que falhar em completar qualquer uma destas etapas, será eliminada. O FvW participa de uma série de eventos deste processo. Adaptado de Gutman e Fidler<sup>14</sup>.

Gassic e colaboradores estudaram primeiramente este fenômeno utilizando um modelo experimental murino. Estes autores demonstram haver relação entre o potencial que têm determinadas linhagens de células tumorais de provocar agregação plaquetária *in vitro* e o desenvolvimento de metástases *in vivo*. Foram testadas 31 linhagens celulares, das quais 15 produziam agregação *in vitro*. A injeção destas células nos animais resultava em trombocitopenia e desenvolvimento de um maior número de metástases em comparação às células de tumores sem a mesma atividade <sup>46</sup>.

Os mesmos autores observaram que o pré-tratamento com anticorpos antiplaquetários, que induzem à trombocitopenia, reduz significativamente a ocorrência de implantes pulmonares após a injeção intravenosa de células tumorais TA3 em camundongos <sup>47</sup>. Posteriormente, constatou-se que uma suspensão de plaquetas e células HUT20 (tumor murino indiferenciado), com atividade de agregação plaquetária *in vitro*, aderiu ao subendotélio da aorta de coelhos, o que não ocorria com outros tumores sem a mesma ação. A adesão dos complexos tumor-plaquetas era reduzida quando os vasos eram tratados com prostaglandina E<sub>2</sub> ou prostaciclina, ambas com ação inibidora da atividade das plaquetas <sup>48</sup>.

Esses achados iniciais foram confirmados por vários estudos experimentais com diferentes modelos animais <sup>49, 50, 51, 52</sup>. Estudos com linhagens tumorais humanas também obtiveram resultados semelhantes <sup>53, 54, 55</sup>. Foram

analisados diversos agentes destinados a diminuir a interação entre plaquetas e células tumorais, incluindo anticoagulantes, inibidores plaquetários e agentes indutores de trombocitopenia, com graus variáveis de sucesso na redução da formação de metástases. Os melhores resultados foram registrados com os indutores de trombocitopenia, a exemplo dos anticorpos antiplaquetários, que foram efetivos em todos os modelos experimentais de metastatização<sup>56, 57, 58, 59</sup>.

A combinação com as plaquetas, portanto, garante a viabilidade das células tumorais conferindo a estas proteção contra o ataque do sistema de defesa e uma maior adesividade ao endotélio vascular nos leitos capilares dos órgãos alvo (figura 3)<sup>60, 61</sup>. Neste ponto específico do processo de metastatização se torna importante a atividade do FvW.

A interação plaquetas-FvW-células tumorais foi inicialmente investigada através de um modelo experimental murino. Constatou-se que, *in vitro*, o anticorpo monoclonal 10E5, que impede a ligação da proteína adesiva fibronectina e do FvW ao complexo GpIIb-GpIIIa na membrana das plaquetas, inibiu a ligação das células tumorais CT26 de camundongos e das células HCT8 de adenocarcinoma de colon humano às plaquetas em 63-65%, enquanto um anticorpo monoclonal irrelevante, 3B2, não teve qualquer efeito<sup>61</sup>.

O anticorpo monoespecífico para o FvW inibiu a ligação em 75-81%. *In vivo* o anticorpo policlonal monoespecífico anti FvW murino diminuiu o número de metástases pulmonares induzidas pelas células tumorais CT26 em 53-64%, pelas células de melanoma amelanótico B16 em 45% e pelas células de tumor de

bexiga T241 de Lewis em 46%, sem indução de trombocitopenia. As metástases pulmonares com as células CT26 foram evitadas com a indução de trombocitopenia e reconstituídas pela infusão de plaquetas humanas ou murinas<sup>61</sup>.

A reconstituição das metástases pulmonares com plaquetas humanas pôde ser inibida em 77% pela pré incubação destas com o anticorpo 10E5 antes da infusão no rato. Desta forma, as plaquetas parecem contribuir para o desenvolvimento de metástases através de sua aderência às células tumorais via proteínas de ligação fibronectina e FvW<sup>61</sup>.

Posteriormente detectou-se, por imunofluorescência e imunocitoquímica, a presença dos complexos GpIb e GpIIb-GpIIIa na membrana plasmática de células humanas de carcinoma cervical MS751 e de carcinoma de colon (clone A). Quando estas linhagens celulares eram pré tratadas com anticorpos específicos contra os receptores GpIb e GpIIb-GpIIIa sua capacidade de agregação plaquetária era significativamente reduzida<sup>56</sup>.

Semelhantes resultados foram obtidos com o uso de células de melanoma humano da linhagem M3Dau, que possuem a propriedade de indução da agregação plaquetária. Ao serem pré incubadas com o anticorpo específico MoAb (LYP18) contra o complexo GpIIb-GpIIIa, estas células perdiam completamente sua capacidade de agregar plaquetas, assim como deixavam de formar complexos tumor-plaquetas<sup>62</sup>.

A ligação entre as glicoproteínas FvW e fibronectina às células tumorais é aumentada pela ação da trombina. Esta proteína é responsável por maior adesividade plaquetária e aumento do número de metástases em várias vezes, conforme determinado por estudos com diversas linhagens tumorais. Este efeito, é prontamente bloqueado pela presença de anticorpos (10E5, tetrapeptídeo RGDS, decapeptídeo de cadeia gama do fibrinogênio LGGAKQAGDV) que sabidamente interferem na ligação do FvW com as integrinas GpIIb-GpIIIa. A ação da trombina, tanto nas plaquetas quanto nas células tumorais, embora ainda não definida precisamente, ocorre provavelmente por aumento na expressão do complexo GpIIb-GpIIIa na superfície celular e por aumento da adesividade deste complexo às suas glicoproteínas de ligação<sup>63,64</sup>.

Este mecanismo foi recentemente revisado à luz das novas técnicas laboratoriais. Nove de nove linhagens celulares tumorais investigadas tiveram sete tipos de receptores de membrana para trombina detectados por PCR. Neste estudo foram confirmados os achados prévios. A adesão das plaquetas foi inibida por anticorpos contra os receptores GpIIb-GpIIIa e contra o FvW. A trombina promoveu ativação de plaquetas e células tumorais, determinando, com isso, a ligação entre ambas<sup>65</sup>.

*In vivo*, estas células ativadas apresentaram maior adesividade ao endotélio vascular assim como ao FvW. A pré infusão de trombina no rato foi responsável por um aumento na formação de metástases pulmonares de até 400 vezes. Tendo em vista que muitos tumores sólidos produzem trombina, os autores postularam que as células tumorais podem, através deste mecanismo,

autoativar um fenótipo metastático <sup>65</sup>. Além desta ação sobre plaquetas e células tumorais, pode-se ainda acrescentar que a trombina também atua diretamente sobre as células endoteliais, estimulando a liberação do FvW por parte destas <sup>66</sup>, <sup>67</sup>.

Floyd e colaboradores investigaram a interação do FvW com duas linhagens celulares hematopoiéticas humanas, a CA46 derivada do linfoma de Burkitt americano (células B indiferenciadas) e a U937 do linfoma histiocítico. O FvW era purificado inicialmente para que se concentrasse em uma preparação livre de fibrinogênio e fibronectina. Em seguida era radiomarcado com iodo <sup>125</sup> e colocado em solução com as células neoplásicas. Houve ligação específica do FvW com ambas as linhagens testadas ao nível de membrana, mesmo na ausência de um agonista. Novamente ocorreu diminuição da ligação com o FvW quando foram acrescentados ao meio peptídeos sintéticos do tipo RGDS ou o anticorpo específico 7E3, ambos com atividade inibitória da ocupação dos receptores GpIIb-GpIIIa <sup>68</sup>.

Foi verificada uma modificação na estrutura multimérica do FvW após duas horas de ligação com as células tumorais, com diminuição do seu peso molecular, tornando-o menos efetivo como agente promotor de agregação plaquetária. Essa alteração não era observada quando estava presente no meio um agente inibidor da protease, o que sugere que exista a produção de uma potente enzima proteolítica pelas células tumorais, a qual provavelmente provoca a alteração estrutural do FvW <sup>68</sup>.

Ao analisar estes achados, Gralnick inferiu que a degradação do FvW pelas células tumorais pode representar, *in vivo*, o mecanismo pelo qual estas células se libertam da proteína e das plaquetas, quando já aderidas ao endotélio vascular do sítio de implantação, o que permitiria a sua disseminação para o parênquima do órgão alvo onde posteriormente se desenvolveria a lesão metastática <sup>69</sup>.

Utilizando uma outra abordagem, um estudo experimental teve como objetivo a dosagem, pelo método de ELISA, das concentrações do FvW no sobrenadante de três diferentes meios de cultura: de células endoteliais humanas derivadas de veia umbilical, de adenocarcinoma de colon humano (HRT-18), e de uma combinação das duas culturas anteriores. Não se registrou qualquer dosagem do FvW no sobrenadante da cultura de células HRT-18. Já os valores obtidos da combinação células endoteliais/HRT-18 estavam significativamente elevados ( $P = 0.0048$ ) em comparação aos valores da cultura de células endoteliais isoladas. Demonstrou-se assim que as células tumorais HRT-18 não produzem o FvW, mas tem a capacidade de induzir as células endoteliais a aumentar a produção deste <sup>70</sup>.

Este aumento de produção do FvW pode ser mediado por fatores tumorais diversos daqueles já referidos. Em um experimento com seis voluntários saudáveis observou-se um aumento significativo dos níveis plasmáticos do antígeno do FvW após a injeção em bolo do fator de necrose tumoral <sup>71</sup>. Em meio de cultura de células de endoteliais houve uma elevação de

200% na liberação do FvW na presença do fator de permeabilidade vascular, uma proteína que se liga a heparina e é secretada por tumores sólidos<sup>72</sup>.

Oleksowicz e colaboradores demonstraram, em amostras de plasma de pacientes com tumores metastáticos disseminados, um aumento de 91% ( $P < 0.0009$ ) nos níveis do antígeno do FvW e de 207% ( $P < 0.0009$ ) na atividade do co-fator ristocetina. Através da análise por eletroforese em gel de agarose-SDS, foi constatado um aumento de 165% ( $P < 0.001$ ) nas formas multiméricas maiores do FvW em comparação a preparações obtidas de controles com correspondentes tumores sólidos localizados. Nas amostras dos pacientes em estudo ocorreu uma redução substancial na atividade da protease responsável pela clivagem do FvW, sem serem detectados inibidores plasmáticos desta. A presença de metástases se correlacionou com uma atividade da protease menor do que 15%, a ausência, com uma atividade maior que 88% ( $n=20$ ;  $P < 0.0001$ )<sup>73</sup>.

Finalmente, no plasma enriquecido com plaquetas obtido dos pacientes com doença disseminada, a agregação plaquetária induzida por tumor estava aumentada em 127% ( $P < 0.001$ ) em comparação aos controles com tumores localizados, podendo ser completamente inibida pela incubação prévia com anticorpos monoclonais contra o epitopo de ligação para o FvW no receptor de membrana GpIb ou contra o epitopo de ligação para o GpIb no FvW plasmático, respectivamente. Os autores concluíram, com isso, que as formas multiméricas maiores do FvW encontradas em pacientes com neoplasias disseminadas provavelmente resultam da atividade deficiente de sua protease, o que pode

representar o mecanismo regulador da adesão tumor-plaquetas no processo metastático <sup>73</sup>.

Com um enfoque mais clínico, alguns estudos foram realizados com o objetivo de estabelecer os níveis plasmáticos do FvW em neoplasias de diferentes origens e a correlação destes com fatores prognósticos já estabelecidos. Em um estudo abordando o câncer de próstata, foi dosado o FvW, através de imunoquantificação por ensaio microenzimático, em pacientes com a doença, comparando os resultados destes com aqueles obtidos em pacientes com hiperplasia prostática benigna ou sem doença prostática. Foram observadas diferenças significativas nas dosagens dos indivíduos com câncer em relação às dos indivíduos pertencentes aos outros dois grupos ( $P < 0.05$ ). Da mesma forma, pacientes com tumores metastáticos tinham níveis mais elevados do FvW que os com doença localizada <sup>74</sup>.

Estudo semelhante foi realizado em 14 pacientes com carcinoma de ovário e 21 com carcinoma de colo uterino. No primeiro grupo foram registrados níveis mais elevados de FvW em relação a 20 controles saudáveis, sendo os resultados significativos ( $P < 0.005$ ) somente para as mulheres com os estágios mais avançados (III-IV). Nas pacientes com carcinoma cervical, foram também encontrados níveis significativamente aumentados ( $P < 0.001$ ) apenas nas mulheres com neoplasias mais avançadas (IIb-IV), o que provavelmente foi consequência do número reduzido de tumores precoces na amostra em questão <sup>75</sup>.

Ainda com relação ao carcinoma de colo uterino, posteriormente, foram determinados os níveis pré operatórios do FvW em 38 pacientes com o diagnóstico que se submeteram a histerectomia radical com linfadectomia pélvica. Quando comparados a controles, estes níveis só apresentavam diferença significativa nos casos de estadiamento IIb (tumor com invasão de paramétrio, sem fixação à parede pélvica). Pacientes com esta classificação anatomopatológica apresentavam dosagens significativamente elevadas ( $P < 0.001$ ) em relação àqueles com estádios Ib e IIa (macroinvasão cervical ou do terço superior da vagina). Houve ainda significância na comparação dos níveis correspondentes a tumores com mais de 4cm com aqueles de lesões menores que este tamanho ( $P < 0.02$ ) e na comparação dos valores obtidos na presença ou na ausência de metástases linfonodais ( $P < 0.02$ ). Deve-se ressaltar que não estavam presentes na amostra indivíduos com tumores nos estádio mais avançados, III e IV (invasão de terço inferior da vagina, parede pélvica, bexiga ou reto e metástases à distância) <sup>76</sup>.

Em um estudo de 28 pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço os níveis do FvW eram verificados por eletroimunodifusão antes do tratamento cirúrgico. Deste grupo, 25 pacientes tinham estágios avançados da doença (III e IV). Todos os participantes foram acompanhados por um período médio de 48 meses (mínimo de 41 meses). Quinze pacientes morreram durante este tempo. Os valores do FvW nestes 15 pacientes eram significativamente mais altos que nos 13 sobreviventes ( $P < 0.05$ ), assim como os resultados de todo o grupo estudado eram mais elevados que os encontrados em 24 controles saudáveis. Apesar da amostra ser composta por um grupo heterogêneo de

tumores ( cavidade oral, laringe e faringe) e da eventual diferença no tratamento empregado, os dados sugerem que o FvW pode ter importância prognóstica, bem como implicações terapêuticas para estes tumores. Para comprovação desta hipótese os autores reconheceram que seria necessário um estudo prospectivo com uma amostra maior e mais específica <sup>77</sup>.

Finalmente, Paczuski e colaboradores analisaram, pelo método de ELISA, os níveis do FvW em um grupo de 37 pacientes com carcinoma planoepitelial de laringe. Foi encontrada diferença significativa em pacientes com tumores classificados como T<sub>4</sub> (T,N,M) e em estágio IV, que representam os casos com doença metastática (n=17 e n=23 respectivamente,  $P < 0.0001$ ), em comparação a 48 controles. Pacientes com linfonodos comprometidos tinham nível médio do FvW de 204%, enquanto aqueles com linfonodos negativos de apenas 142% ( $P < 0.0001$ ). Segundo os autores, estes resultados demonstram uma correlação entre os níveis plasmáticos do FvW e o estadiamento dos pacientes com tumores de laringe e sugerem que o acompanhamento do grupo em estudo possa estabelecer a utilidade do FvW como determinante da aplicação de tratamento adjuvante <sup>78</sup>.

Em relação aos tumores de colon e reto, não existem atualmente estudos publicados que avaliem a importância do FvW nos pacientes portadores destas neoplasias. Com base nos dados acima apresentados, estudamos os níveis plasmáticos do FvW em pacientes com adenocarcinoma colorretal, a fim de validar a sua associação com as principais variáveis clínico-patológicas desta doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar os níveis plasmáticos do FvW em pacientes com adenocarcinoma colorretal.

### **2.2 Objetivos específicos**

Correlacionar os níveis plasmáticos do FvW com as seguintes variáveis clínico-patológicas:

- a) estadiamento da doença
- b) invasão tumoral de órgãos adjacentes
- c) presença de metástases á distância
- d) tamanho tumoral
- e) diferenciação histológica
- f) dosagem plasmática do antígeno carcino-embriônico (CEA)

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo de transversal controlado, com unidade de estudo individual.

#### **3.2 População estudada**

Foram estudados 90 pacientes com adenocarcinoma colorretal primário, submetidos à cirurgia eletiva pela equipe de Coloproctologia (ECP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de fevereiro de 1999 a maio de 2000. Como grupo controle, foram analisados 103 indivíduos saudáveis, provenientes da população de doadores do banco de sangue do HCPA.

Foram considerados elegíveis todos os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal, comprovado por exame anatomopatológico, de ambos os sexos, com idades entre 20 e 87 anos, que foram atendidos no HCPA durante o período de 14 meses. Os pacientes concordavam formalmente em participar do estudo através da assinatura de termo de consentimento informado,

o qual foi previamente aprovado pela Comissão de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do HCPA.

Foram excluídos os pacientes portadores de condições clínicas específicas que sabidamente alteram os níveis plasmáticos do FvW, a exemplo da diabetes mellitus, doenças inflamatórias ou infecciosas, cardiopatia isquêmica e doença hepática<sup>35, 36, 37, 38, 39, 40, 41</sup>. Estas alterações eram detectadas através de história e exame físico minucioso e por exames complementares que fazem parte da avaliação pré-operatória dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.

Pelo mesmo motivo não fizeram parte do estudo os pacientes que apresentavam tumores de outra natureza e localização por ocasião do diagnóstico, ou tinham história pregressa de doenças neoplásicas. Não foi admitida a participação de pacientes operados em caráter de urgência, por estes apresentarem, muitas vezes, complicações que potencialmente podem elevar os valores plasmáticos do FvW, como abscessos intracavitários e peritonite.

Da mesma forma, não participaram do estudo pacientes com tumores recidivados localmente ou com metástases metacrônicas, bem como aqueles que receberam quimioterapia ou radioterapia pré-operatória. Ainda foram excluídos os casos em que os tumores tinham relação com doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. Indivíduos com história de dificuldade de coagulação não eram elegíveis.

Como controles foram utilizados doadores do banco de sangue do HCPA, de ambos os sexos, com idades entre 30 e 60 anos, selecionados ao acaso, que autorizaram sua inclusão no estudo mediante termo de consentimento.

Foram excluídos os indivíduos que relatavam ter diagnóstico ou história de doenças que pudessem interferir nos níveis plasmáticos do FvW. Os doadores respondiam a um questionário padronizado no momento da doação de sangue, com objetivo de verificar a apresentação de qualquer sintoma indicativo das situações nas quais o FvW poderia estar aumentado. Todos os controles tiveram seus níveis glicêmicos determinados por hemoglicoteste realizado por ocasião da coleta da amostra. Níveis acima de 140 mg/dL , assim como a referência de sintomas sugestivos das alterações clínicas específicas já citadas representavam critérios de exclusão do grupo controle. A participação de indivíduos com história de problemas de coagulação não era permitida.

### **3.3 Amostra estudada**

Dos 90 pacientes que inicialmente compunham o estudo, foram excluídos 7 indivíduos com diabetes mellitus, 2 com cardiopatia isquêmica, 2 com cirrose hepática, 1 com câncer de próstata associado e 1 com câncer de pulmão. Tais situações foram evidenciadas por história e exame clínico e através da realização de exames complementares. Houve ainda a exclusão de 2 casos em decorrência de problemas técnicos durante o processamento do plasma para a dosagem do FvW (formação de crioprecipitado nos tubos após o descongelamento).

Dentre os controles, foram eliminados 4 indivíduos que referiram ser portadores de diabetes mellitus, 6 com resultados alterados no hemoglicoteste, 2 com quadro de infecção aguda de vias aéreas superiores e 1 com história de câncer de mama. Dois controles foram excluídos por problemas técnicos. Efetuadas estas exclusões, a amostra ficou constituída de 75 pacientes com adenocarcinoma colorretal e de 88 controles.

### **3.3 Metodologia**

Amostras de sangue dos pacientes eram coletadas na véspera da cirurgia através de punção venosa periférica em tubos de vidro tipo *vacutainer* de 5 ml, contendo um volume de 1:10 do anticoagulante citrato de sódio. Em seguida, eram centrifugadas a 3500g por 15 minutos, sendo assim separados os elementos figurados do plasma, que era então armazenado em tubos de polietileno de 1,5 ml a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras de sangue dos controles eram coletadas por ocasião da doação no banco de sangue do HCPA, sendo submetidas ao mesmo processo.

Posteriormente, o plasma era transportado até o Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde, após descongelado em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, era analisado para determinação da dosagem do FvW. Todas as aferições foram feitas pessoalmente pela Dra. Eliane

Bandinelli, sendo realizada esta atividade sob a supervisão do Dr. Israel Roisemberg. Nenhum dos dois pesquisadores sabia se amostra provinha de pacientes ou de controles, ou tinha conhecimento de qualquer variável clínico-patológica dos pacientes.

A dosagem do FvW era realizada através da quantificação do nível plasmático do antígeno do FvW (FvWAg) que era determinado por imunoelektroforese quantitativa, também conhecida como eletroimunoensaio<sup>79</sup>. A técnica se baseia no emprego de gel de agarose (Bio-Rad<sup>R</sup>, Standard-low) acrescido de soro com anticorpos policlonais anti FvWAg, desenvolvido em coelhos, que foi cedido pelo Dr. T.S. Zimmerman (Scripps Clinic & Research, La Jolla, CA, USA) e utilizado na concentração de 0,67%. O gel imune composto é distribuído uniformemente na superfície de placas retangulares de vidro com 2 mm de espessura, medindo 10 cm x 8cm, numa quantidade de 15 ml por placa.

As amostras de plasma a serem testadas diluídas a 1/2 em BBS (0,730 g de cloreto de sódio, 0,276 g de barbital, 0,206g de barbital sódico, 0,100g de azida sódica e água para 100 ml de solução) são aplicadas à placa com gel em orifícios que comportam alíquotas de 15 microlitros. Também são aplicadas à placa, alíquotas de plasma controle (proveniente de um *pool* do próprio laboratório) com uma diluição de 1/2, 1/4 e 1/8, correspondendo respectivamente às concentrações de 100%, 50% e 25% de FvWAg. Em seguida, a placa é colocada sob a influência de um campo elétrico (eletroforese) a 2 V/cm, por 18 horas.

Este método leva a precipitação de complexos antígeno-anticorpo que migram sobre a superfície da placa formando figuras com formato de foguetes (figura 4). Para que estas figuras sejam identificadas, é necessário que as placas sejam lavadas em solução fisiológica por no mínimo 4 horas, prensadas, secadas em estufa a 50°C e coradas com Azul de Comassie. A altura das figuras de precipitação é então medida através de uma reta de calibração (regressão logaritimica altura x concentração). Os valores obtidos correspondem à concentração de FvWAg presente em cada amostra de plasma aplicada, tendo o plasma controle como parâmetro para comparação. Os resultados da aferição são expressos em unidades por decilitro (U/dL).



FIGURA 04 – Lâmina de vidro com complexos antígeno-anticorpo formando as figuras em “fogete”.

### **3.4 Avaliação clínico-patológica**

Todos os pacientes eram avaliados no período pré-operatório através de uma seqüência de exames para diagnóstico e estadiamento da doença. Após a realização de história e exame físico completo, os pacientes eram submetidos à colonoscopia com biópsia das lesões. Obtinha-se assim material para realização de exame anatomopatológico através do qual era comprovado o diagnóstico e estabelecido o grau de diferenciação histológica de cada tumor.

A extensão da doença era avaliada por ultrassonografia ou tomografia computadorizada de abdômen, raio X de tórax, provas de função hepática e dosagem do antígeno carcinoembriônico (CEA). Além destes testes, eram solicitados eletrocardiograma, hemograma, bioquímica completa, provas de função renal, tipagem sanguínea e provas de coagulação, que incluíam contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP) e tempo parcial de tromboplastina (KTTP).

O estadiamento de cada paciente, como de costume ocorre nos casos de adenocarcinoma colorretal, somente era completado após a revisão trans-operatória e, quando a ressecção tumoral era possível, com o anatomopatológico

definitivo da peça cirúrgica. Os pacientes eram subdivididos em estágios evolutivos de acordo com a classificação de Dukes, modificada por Turnbull (tabela.01)<sup>80,81</sup>. Os valores dosados do FvW eram então correlacionados com os dados referentes ao estadiamento e fatores prognósticos de cada paciente.

TABELA 01 – Estadiamento de Dukes modificado por Turnbull

Estadiamento	Extensão da Neoplasia
A	Tumor limitado à parede intestinal
B	Tumor extendendo-se até gordura perintestinal
C	Metástases para linfonodos regionais
D	Metástases à distância ou tumor irressecável por invasão parietal ou de órgãos adjacentes

### 3.5 Análise estatística

Inicialmente foram obtidas tabelas de frequência para todas as variáveis em estudo. As variáveis quantitativas foram descritas com média e desvio padrão e as categóricas através de percentuais. O grupo de pacientes com carcinoma colorretal e o grupo de controles tiveram os níveis plasmáticos do FvW primeiramente comparados pelo teste T de Stuart. Potenciais diferenças etárias entre os grupos foram ajustadas através da regressão linear múltipla.

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se tabelas de contingência, proporções e teste de qui-quadrado. As comparações de dados

quantitativos entre três ou mais grupos, a exemplo da classificação tumoral por estadiamento e outras variáveis de múltiplos níveis, foram realizadas por análise de variância. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram processados com auxílio do programas Epi Info (versão 6) e *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows* (versão 6).

### **3.6 Ética**

O presente estudo foi avaliado pelo Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de porto Alegre, Grupo de Pesquisa e Pós Graduação (GPPG), tendo sido aprovado no processo de número 99216.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características genéricas da amostra

A amostra estudada foi constituída de 162 indivíduos, 75 pacientes (46,3%) e de 87 controles (53,7%), estando suas características genéricas principais expressas na tabela 02.

TABELA 02 – Características genéricas \*

	Pacientes (n = 75)	Controles (n = 87)	<i>P</i>
Sexo masculino. No (%)	37 (49,3)	44 (50,6)	0,87
Sexo feminino. No (%)	38 (50,7)	43 (49,4)	0,87
Idade média em anos $\pm$ dp	60,2 $\pm$ 14,8	50 $\pm$ 6,1	0,001
Tipo sanguíneo O. No (%)	32 (42,7)	37 (42,5)	0,99
Raça negra. No (%)	2 (2,7)	1 (1,1)	0,86
Raça branca. No (%)	73 (97,3)	86 (98,9)	0,86

\*Dados apresentados em número, com porcentagens dentro de cada grupo entre parênteses, dp = desvio padrão. Tipo O, sistema ABO. *P* expressa a diferença estatística entre os grupos.

Em relação à localização, a maioria dos carcinomas comprometeu o reto e o colon sigmóide, sendo os procedimentos cirúrgicos mais realizados a retossigmoidectomia anterior e a colostomia para derivação do trânsito colônico nos casos de tumores irresssecáveis (tabelas 03 e 04).

TABELA 03 – Localização tumoral

Localização tumoral	n	%
Reto	39	52,0
Colon sigmóide	18	24,0
Ceco	5	6,7
Ângulo hepático	4	5,3
Colon transverso	3	4,0
Ângulo esplênico	2	2,5
Colon ascendente	1	1,3
Colon descendente	1	1,3
Múltiplas (lesões sincrônicas)	2	2,7

TABELA 04 – Procedimentos cirúrgicos

Procedimentos cirúrgicos	n	%
Retossigmoidectomia anterior	20	26,7
Colostomia (derivação)*	15	20,0
Sigmoidectomia	12	16,0
Amputação abdominoperineal	11	14,7
Colectomia direita	8	10,7
<i>By pass</i> colônico	4	5,3

Colectomia total	3	4,0
Colectomia esquerda	2	2,7

---

\*Somente incluídos casos em que a colostomia foi feita devido à irresecabilidade do tumor.

A classificação dos pacientes por estadiamento está demonstrada na tabela 05. Não foram observadas diferenças nas distribuições de sexo, idade, raça, tipagem sanguínea ou diferenciação histológica das lesões nos diferentes estádios clínico-patológicos.

TABELA 05 – Estadiamento tumoral

Estadiamento	No.	%
A	8	10,7
B	23	30,7
C	17	22,7
D	27	36,0

#### 4.2 Níveis plasmáticos do FvW

A média e o desvio padrão ( $\pm dp$ ) do FvW observado nos pacientes com adenocarcinoma colorretal foi de  $230,6 \pm 96$  U/dL e nos controles foi de  $150,2 \pm 58$  ( $P < 0,0001$ ). Quanto ao resultado das medianas, os pacientes têm 208 U/dL, com uma variação de 87 a 588, e os controles 136 U/dL, com uma variação de 43 a 296 ( $P < 0,001$ ).

Entretanto, conforme demonstrado na tabela 02, houve uma diferença significativa entre a idade média dos pacientes, que é de  $60,2 \pm 14,8$  anos (variação entre 20 e 87 anos) e a dos controles, que é de  $50 \pm 6,1$  anos (variação entre 30 e 60 anos). Tendo em vista que foi descrita uma tendência à elevação nos níveis plasmáticos do FvW com a idade, foi necessário o emprego de uma correção estatística dos resultados obtidos para evitar a possibilidade desta variável representar um fator de confusão<sup>82, 83</sup>.

Inicialmente demonstrou-se através da técnica de regressão linear simples que o FvW sofre um aumento de 2U/dL para cada ano de vida ( $P < 0,04$ ). Em seguida foi aplicada a regressão linear múltipla para os resultados do FvW considerando a diferença etária entre os dois grupos. Desta forma, verificou-se que a concentração média do FvW nos pacientes com câncer, que primeiramente era superior em 80 U/dl, ficou em 77,7 U/dL após o ajuste, evidenciando que a variável idade tem uma influência negligenciável nos resultados obtidos.

### **4.3 FvW e estadiamento tumoral**

Verificou-se uma relação direta entre os níveis plasmáticos do FvW e o estadiamento dos pacientes. Na tabela 06 estão expressas as concentrações do FvW para cada estágio clinico-patológico, sendo incluídos também os resultados

do grupo controle para fins de comparação. A figura 04 ilustra graficamente a correlação descrita.

TABELA 06 – Níveis plasmáticos do FvW e dp por estadiamento

Estadiamento	N.o	FvW média $\pm$ dp	FvW mediana (variação)
Controles	87	150,2 $\pm$ 58,1	136 (43 – 296)
A	8	192,2 $\pm$ 62,2	178 (130 – 331)
B	23	224,8 $\pm$ 73,0	208 (92 – 404)
C	17	213,9 $\pm$ 96,5	205 (87 – 376)
D	27	257,6 $\pm$ 116,6	230 (94 – 588)

$P < 0,0001$  para médias,  $P < 0,01$  para medianas

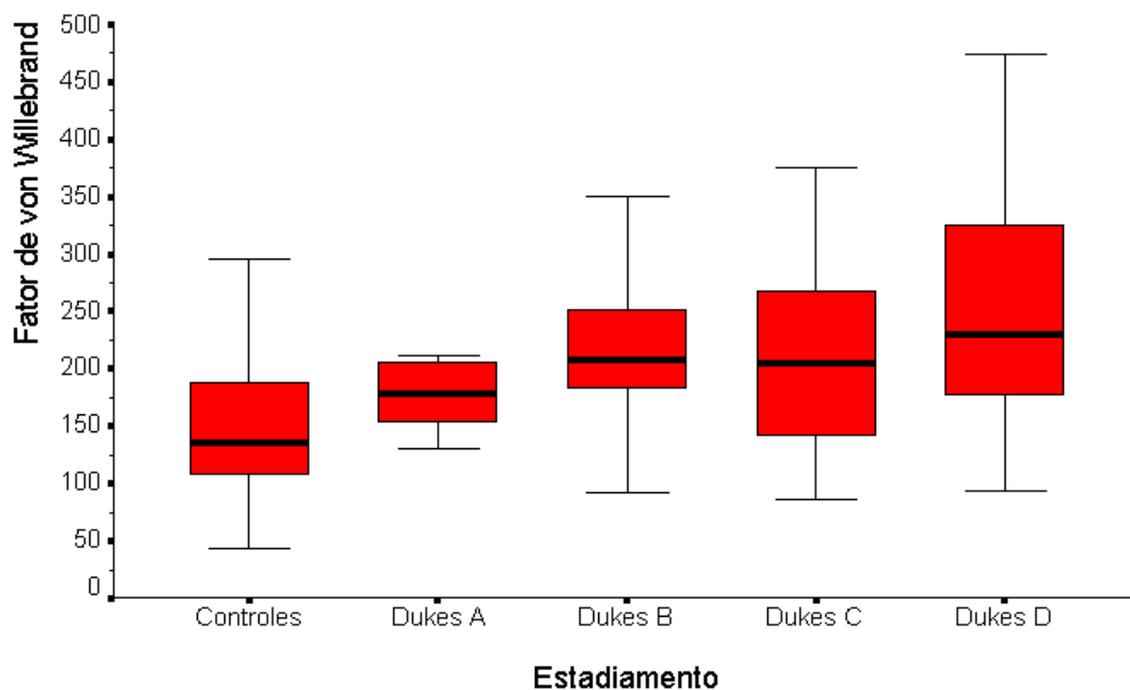


FIGURA 05 – Representação gráfica dos níveis do FvW com estadiamento tumoral

Mais uma vez foi necessária a utilização da regressão linear múltipla, levando-se em consideração a idade para o ajustamento das concentrações do FvW em relação ao estadiamento tumoral. Foi possível determinar uma elevação constante de 25 U/dL ( $P < 0,0001$ ) para cada nível de estadiamento do adenocarcinoma (tabela 07). A equação resultante para o FvW por estágio, após o ajuste por idade foi:

$$\text{FvW} = 118,1 + 24,8 \times \text{Estádio} + 0,7 \times \text{Idade}$$

TABELA 07 – Níveis do FvW por estadiamento após ajuste

pela idade

Estadiamento	No.	FvW
Controles	87	153,1
A	8	184,9
B	23	209,7
C	17	234,5
D	27	259,3

 $P < 0,0001$ 

#### 4.4 FvW e tamanho tumoral

Pacientes com tumores de tamanho maior que 5 cm no maior diâmetro (n = 40) tiveram um nível médio e dp do FvW de  $251,3 \pm 92,4$  U/dL. Pacientes portadores de tumores com menos de 2 cm (n = 5) e de 2 a 5 cm (n = 30) apresentaram concentrações de  $206 \pm 72,5$  e  $207,2 \pm 100,5$  U/dL respectivamente. Apesar de ter sido encontrada uma diferença, esta não atingiu significância estatística.

As medianas obtidas para as lesões maiores que 5 cm, com menos de 2 cm e de 2 a 5 cm foram 246 U/dl (87 – 474), 186 (152 – 331) e 183,5 (92 – 588) respectivamente. A diferença entre os grupos, em contraste com a obtida na comparação das médias foi estatisticamente significativa ( $P < 0,02$ )

#### 4.5 FvW e invasão tumoral de órgãos adjacentes

Em cinqüenta e dois casos não houve invasão neoplásica de órgãos adjacentes, tendo ocorrido o oposto em 23 pacientes. A tabela 08 mostra os diversos padrões de invasão encontrados.

TABELA 08 – Invasão de órgãos adjacentes

Órgão invadido	No.	%
Bexiga	8	34,7
Útero	3	13,0
Fígado	2	8,7
Duodeno	2	8,7
Íleo	2	8,7
Pâncreas	1	4,3
Outros	5	21,7

Foi observada uma diferença de 62 U/dL ( $P < 0,009$ ) na concentração do FvW nos pacientes com tumores que invadiam outras estruturas em relação aos demais, com médias de 273,6 e 211,6 U/dL respectivamente. Os pacientes com lesões invasivas tinham uma mediana de 274 U/dL (94 – 588) e os pacientes com lesões sem este padrão de 200 U/dl (87 – 404), sendo esta diferença significativa ( $P < 0,02$ ).

#### 4.6 FvW e metástases á distância

Dezesseis pacientes apresentaram metástases em outros órgãos (tabela 09). A média do FvW neste grupo foi de  $276,6 \pm 117,2$  U/dL e nos pacientes com doença não metastática foi de  $215,9 \pm 85,5$  U/dL. A diferença de 60,7 U/dL, atingiu significância estatística ( $P < 0,02$ ). A mediana dos pacientes com metástases foi 278 U/dL (133 – 588) e a dos pacientes sem esta característica foi 203 U/dL (87 – 474), atingindo esta diferença significância ( $P < 0,05$ ).

TABELA 09 – Localização das metástases

Localização	No.	%
Fígado	13	81,25
Pulmão	2	12,5
Ovário	1	6,25

#### 4.7 FvW e CEA; FvW e diferenciação histológica

O FvW foi comparado com o nível sérico do CEA, não sendo possível estabelecer uma correlação entre ambos. As concentrações do CEA variaram de 0,5 até 26543 ng/ml, não tendo relação significativa com a progressão de estadiamento tumoral.

O mesmo se verificou quanto ao grau de diferenciação histológica dos tumores, que está representado na tabela 10. A distribuição dos tumores mais

agressivos (pouco diferenciados e do tipo mucinoso) não variou entre os estágios de Dukes (tabela 11).

TABELA 10 – Diferenciação histológica dos tumores

Grau de diferenciação	No	%
Bem diferenciados	4	5,3
Moderadamente dif.	58	77,3
Pouco diferenciados	7	9,3
Tipo mucinoso	6	8,0

TABELA 11 – Distribuição dos tumores mucinosos ou pouco diferenciados por estágios

Estadiamento	No	%
A	2	25
B	3	13
C	4	23
D	4	15

Pacientes portadores de tumores pouco diferenciados ou do tipo mucinoso tiveram níveis médios do FvW de  $234 \pm 101$  U/dL, enquanto àqueles com tumores bem ou moderadamente diferenciados tiveram níveis de  $214 \pm 65$  U/dL. As respectivas medianas foram 212 U/dL (97 – 352) e 203 U/dL (87 – 588). Não foram observadas diferenças significativas quando comparadas estas medidas.

## **5. DISCUSSÃO**

Este é o primeiro estudo a ser publicado na literatura que documenta o comportamento do FvW em pacientes com adenocarcinoma colorretal. Pacientes com diferentes tipos de neoplasias tiveram registrados níveis plasmáticos elevados do FvW. Em relação aos tumores digestivos e em particular ao adenocarcinoma colorretal, até o presente momento não havia sido realizado qualquer estudo no sentido determinar a relação desta proteína com os diversos fatores prognósticos da doença.

Inicialmente, foi possível demonstrar um aumento estatisticamente significativo na concentração do FvW nos pacientes com adenocarcinoma colorretal em relação a controles saudáveis. O fato de haver uma diferença entre a idade média dos dois grupos, sendo os pacientes 10 anos mais velhos que os controles, tornou necessário o emprego de uma correção estatística dos dados. O nível médio do FvW dos pacientes com câncer, que inicialmente era de 80 U/dL superior ao nível dos controles ( $P < 0,001$ ), ficou em 77,7 U/dL após o ajuste pela técnica da regressão linear múltipla. A variação etária teve portanto uma influência muito pequena neste resultado. Não foram feitas correções estatísticas por sexo, raça, ou grupo sanguíneo, já que a distribuição destas variáveis era semelhante nos dois grupos (tabela 02).

O achado mais relevante deste estudo foi a relação direta do FvW com o estadiamento tumoral. Os valores dosados do FvW tiveram uma elevação com a progressão dos níveis da classificação modificada de Dukes, sendo a média dos pacientes com o estágio A 192,2 U/dL e a dos pacientes com estágio D 256,7 U/dL. Mais uma vez, a potencial diferença na distribuição das idades entre cada estágio poderia representar um fator de confusão na interpretação dos resultados. O ajuste dos dados por regressão múltipla, considerando a variação etária, possibilitou uma visão mais clara e linear do fenômeno. Conforme demonstrado na tabela 08, há um aumento de 25 U/dL no FvW para cada nível de estadiamento ( $P < 0,0001$ ).

A importância destes dados se deve ao fato de que, apesar de diversos fatores prognósticos para o adenocarcinoma colorretal terem sido estudados, a classificação patológica de Dukes permanece como o principal determinante da sobrevida dos pacientes e tempo livre de doença<sup>84,85</sup>.

Em contraste com estudos abordando neoplasias ginecológicas, de cabeça e pescoço e de laringe, os pacientes com adenocarcinoma colorretal manifestaram a tendência à elevação dos níveis plasmáticos do FvW, em comparação aos controles, mesmo no estágio mais precoce da doença (Dukes A)<sup>75, 76, 77, 78</sup>. Este resultado vem ao encontro da fisiopatologia da elevação do FvW nas neoplasias, uma vez que tumores maiores de 2 a 3 milímetros cúbicos, já desencadearam a seqüência da angiogênese, sendo nutridos por vasos neoformados<sup>16, 19, 20</sup>. É provável que os demais estudos não tenham observado uma diferença semelhante por terem trabalhado com menor número de pacientes.

Os níveis plasmáticos superiores do FvW nos pacientes com câncer são determinados por uma série de mecanismos biológicos complexos e interligados. A angiogênese parece ser a etapa inicial deste processo. A proliferação vascular acelerada se dá em resposta a proteínas estimuladoras secretadas pelo tumor, sendo a principal o fator de crescimento do endotélio vascular<sup>16, 19, 20</sup>. As células endoteliais passam a apresentar modificações ultraestruturais características de um estado ativado, com maior produção protéica<sup>43</sup>.

Conforme estudo realizado por Zanetta e colaboradores, usando a técnica de PCR, a incubação de células endoteliais de veia umbilical humana em meio com alta concentração do fator de crescimento do endotélio vascular leva a um aumento de várias vezes na produção do RNAm para o FvW <sup>44</sup>.

Além disso, recentemente foi demonstrada uma redução significativa na protease responsável pela clivagem do FvW no plasma de pacientes com tumores sólidos disseminados. A esta diminuição correspondia um aumento proporcional das concentrações do FvW, especialmente em sua forma multimérica maior e mais ativa <sup>73</sup>.

A análise de certos aspectos particulares do adenocarcinoma colorretal permite acrescentar elementos novos à discussão. Independentemente do estadiamento ao qual pertenciam, pacientes com neoplasias que invadiam estruturas adjacentes tinham níveis mais elevados do FvW em comparação àqueles com neoplasias sem este comportamento ( $P < 0,009$  para médias e  $P < 0,02$  para medianas). Este dado não pode ser explicado simplesmente pelo maior volume destes tumores, já que pacientes com lesões de menos de 2 cm<sup>3</sup> e com lesões de 2 a 5 cm<sup>3</sup> apresentaram níveis médios de FvW praticamente idênticos. Pacientes com tumores maiores de 5 cm<sup>3</sup> apresentaram concentrações mais elevadas do FvW, porém sem significância em comparação às lesões menores quando eram analisadas as médias.

O dano tecidual às estruturas anatômicas invadidas, com resposta inflamatória associada, pode contribuir para a elevação no FvW verificado

nestes casos. Tal qual ocorre nas infecções agudas e doenças inflamatórias, o FvW pode estar aumentado não apenas pela proliferação vascular acelerada, mas também em consequência do dano endotelial ativo (reação de fase aguda)<sup>37, 38, 39, 40</sup>. Além disso, vários autores relataram que o tamanho do tumor tem uma relação pouco significativa com o prognóstico da doença<sup>86, 87</sup>.

No presente estudo, os pacientes com adenocarcinoma colorretal metastático apresentaram níveis superiores do FvW em relação aos pacientes com doença localizada ( $P < 0,02$ ). Este dado está fortemente associado ao papel desempenhado pela proteína no processo de disseminação tumoral hematogênica. O FvW é o principal promotor da interação entre as células neoplásicas na circulação e as plaquetas, agindo como verdadeira ponte através da qual se dará esta ligação. Desta maneira, será formado o “êmbolo neoplásico” que garante a viabilidade das células tumorais, conferindo a estas proteção contra a ação do sistema imunológico e maior adesividade aos leitos capilares dos órgãos alvo<sup>60, 61</sup>.

Vários estudos experimentais demonstraram que a inibição da atividade plaquetária ou a indução de trombocitopenia levam a uma diminuição significativa do número de metástases produzidas<sup>46, 49, 50, 51</sup>. Nesta linha de abordagem, o estudo de Karpatkin e colaboradores foi essencial para definição da função do FvW neste processo. O uso de anticorpos específicos contra o FvW e contra seus receptores celulares (GpIIb-GpIIIa), em camundongos, diminuiu dramaticamente a ligação entre as células tumorais e as plaquetas e, em consequência, reduziu o número de metástases pulmonares em até 64%<sup>61</sup>.

Resultados semelhantes foram posteriormente reproduzidos por outros modelos experimentais<sup>62, 65, 73</sup>.

A atividade do FvW é potencializada pela ação da trombina. Esta proteína provoca um aumento na expressão do complexo GpIIb-GpIIIa na superfície celular das células tumorais e das plaquetas, bem como promove uma maior afinidade entre estes receptores e o FvW<sup>63, 64</sup>. A infusão de trombina em modelos animais leva a produção de um maior de metástases, sendo este efeito prontamente bloqueado por anticorpos contra o FvW ou contra os receptores GpIIb-GpIIIa<sup>65</sup>.

Desta forma, os níveis aumentados do FvW nos pacientes com o adenocarcinoma disseminado, podem não apenas refletir a presença de uma maior massa de tecido neoplásico e de vasos neoformados, mas também representar o componente indispensável, sem o qual o processo de metastatização não teria efetivamente ocorrido.

Não foi observada associação entre o FvW e a dosagem sérica do CEA. Algumas considerações podem ser elucidativas a este respeito. Sabe-se que o CEA está elevado em 40 a 70% dos pacientes com diagnóstico de carcinoma colorretal, sendo inversamente proporcional ao grau de indiferenciação histológica das lesões. Noventa e cinco por cento dos pacientes com tumores bem diferenciados tem níveis aumentados do antígeno, enquanto o mesmo ocorre em apenas 30% dos tumores pouco diferenciados<sup>85</sup>. Notadamente, em

um paciente portador de um tumor com tal grau de diferenciação, uma dosagem normal pré-operatória do CEA não sugere uma evolução favorável da doença <sup>88</sup>.

Os resultados descritos na literatura considerando a validade do CEA como fator prognóstico são controversos. Alguns autores encontraram uma correlação linear entre o estadiamento tumoral (também usando a classificação de Dukes) e os níveis séricos do antígeno, tendo observado que pacientes com CEA superior a 10 ng/ml tem 3,24 vezes mais chance de apresentar recorrência da doença <sup>87</sup>. Em contrapartida, estudos desenvolvidos com o mesmo objetivo, chegaram a resultados exatamente opostos <sup>89,90</sup>.

Embora exista uma tendência à aceitação do CEA como fator prognóstico do adenocarcinoma colorretal, sua principal utilidade é a de controle da recidiva pós-operatória, através da dosagem em intervalos regulares <sup>91,92</sup>. Na presente amostra, não foi demonstrada correlação significativa entre a dosagem pré-operatória do CEA e o estadiamento das lesões.

Não foi verificada associação entre o FvW e o grau de diferenciação histológica dos tumores. Resultados semelhantes foram verificados por Ohtani e Nagura, ao estudarem a microvasculatura do estroma de carcinomas gástricos por microscopia eletrônica. Estes autores observaram que as células endoteliais dos capilares que irrigavam os tumores com diferenciação histológica do tipo intestinal apresentavam maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso, onde se localizava, assim como nos corpos de Weibel-Palade, a maior concentração do FvW. Tal padrão serviu para evidenciar uma mudança das

células endoteliais para um estado de produção protéica ativa. Nas células endoteliais dos tumores indiferenciados, tais variações estruturais das não eram tão marcantes, ocorrendo um número menor de alterações hipertróficas para produção do FvW<sup>43</sup>.

Na presente amostra os tumores menos diferenciados ou os do tipo mucinoso não apresentaram níveis mais elevados do FvW. A interpretação deste dado deve levar em conta que não houve maior incidência destes tipos de lesão entre os estágios mais avançados da doença (Dukes C e D). Ou seja, o aumento nos níveis do FvW encontrados nos pacientes com adenocarcinoma colorretal depende de condições relacionadas á angiogênese e ao estadiamento tumoral e não do grau de diferenciação histológica das lesões.

Os resultados deste estudo demonstram a associação do FvW com fatores prognósticos relevantes para o adenocarcinoma colorretal. Embora tenha sido analisada uma amostra de tamanho relativamente reduzido, foi possível demonstrar que níveis plasmáticos elevados desta proteína podem representar um importante indicador do comportamento biológico do tumor. O papel desempenhado pelo FvW no processo metastático reforça esta idéia e indica que o aumento verificado nos pacientes com adenocarcinoma colorretal possa ter influência na evolução da doença.

## **7. CONCLUSÕES**

### **7.1 Conclusão Geral**

Os níveis plasmáticos do FvW estão significativamente aumentados nos pacientes com adenocarcinoma colorretal ( $P < 0,0001$ ).

## 7.2 Específicas

- a) Existe associação significativa entre o FvW e o estadiamento clínico-patológico da doença ( $P < 0,0001$ ).
- b) Existe associação entre o FvW e a presença de invasão tumoral de estruturas anatômicas adjacentes ( $P < 0,02$ ).
- c) Existe associação entre o FvW e a ocorrência de metástases hematogênicas á distância ( $P < 0,05$ ).
- d) Não há correlação significativa do FvW com tamanho tumoral, diferenciação histológica das lesões e dosagens séricas do CEA.

## 8. PERSPECTIVAS

Os dados apresentados abrem a perspectiva da realização de dois novos estudos subseqüentes, seguindo a mesma linha de investigação. O primeiro representa a continuação natural do presente trabalho e consiste no acompanhamento regular dos pacientes com adenocarcinoma colorretal aqui estudados. Será realizado um estudo de coorte, devendo ser considerado o tempo

livre de doença e a sobrevida dos pacientes em comparação com os níveis do FvW determinados no período pré-operatório.

O segundo e de realização mais imediata terá o objetivo de correlacionar os níveis plasmáticos do FvW com a contagem de microvasos por campo de microscopia obtida das peças de anatomopatologia dos pacientes incluídos no estudo atual. Conforme os resultados obtidos, poder-se-á definir o papel do FvW como marcador da neovascularização tumoral.

O câncer colorretal apresenta uma grande heterogeneidade de comportamentos biológicos, sendo os meios clássicos de classificação da doença ainda limitados. Muitas vezes são agrupados em um mesmo estágio tumores que apresentam formas de progressão completamente distintas <sup>11, 93</sup>. Os parâmetros clínico-patológicos hoje utilizados no estadiamento e na avaliação prognóstica dos pacientes deverão ser aprimorados no sentido de incorporar novos conhecimentos sobre o comportamento e evolução da doença.

À semelhança do que vem sendo observado em outras neoplasias malignas, a classificação dos pacientes deverá considerar, em um futuro próximo, as características genéticas e de biologia molecular do tumor <sup>94, 95</sup>. Antecipa-se que o patologista deverá informar não apenas os padrões de diferenciação histológica e extensão do tumor, mas também quais as propriedades biológicas que o mesmo possui.

Ao estudar o FvW em pacientes com adenocarcinoma colorretal, buscou-se a identificação de uma nova variável biológica potencial para a doença. Uma vez que o processo de angiogênese desempenha um papel crítico para o desenvolvimento das metástases tumorais, torna-se relevante a quantificação desta proteína, cujos níveis estão diretamente relacionados à proliferação vascular<sup>20, 96, 97</sup>.

Além disto, existe a possibilidade de que, uma vez identificada sua importância do processo de disseminação neoplásica, O FvW possa representar um novo alvo para o controle da doença. Neste sentido, há uma série de agentes experimentais com ação bloqueadora do processo de metástases em estudos clínicos iniciais envolvendo pacientes com tumores sólidos avançados<sup>98</sup>.

Ao contrário da quimioterapia convencional, via de regra associada à toxicidade significativa para os tecidos normais, espera-se que estas novas estratégias possam apresentar maior seletividade pelo processo neoplásico, elevando o índice terapêutico e contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

## **SUMMARY**

The colorectal adenocarcinoma is one of the most prevalent solid tumors in the world, occupying the third position in both sexes, preceded by lung and stomach carcinoma in men, and by breast and cervix carcinoma in women. In

Brazil, the colorectal adenocarcinoma is among the five more frequent neoplasias, occupying the fifth position in mortality rank. Patients' global survival is around 40% in 5 years, having had a small increase of this rate in the last four decades.

The clinicopathological staging remains the most important prognostic predictor in colorectal adenocarcinoma. The five-year survival rate of patients bearing distant metastases is less than 5%. These lesions are found in 75% of individuals that die from the disease and they represent, most of the time, a terminal event.

The metastatic process follows a sequence of interlinked steps that should be completed by the tumor cell to produce a clinically relevant lesion. The first step is the angiogenesis. This mechanism consists of accelerated endothelial-cell proliferation, resulting in growth of new blood vessels that will allow tumor to grow and send neoplastic cells to circulation.

This neovascularization results in a bigger production of von Willebrand factor, a plasmatic glycoprotein that is essential to the process of primary homeostasis. This protein is released by endothelial cells and platelets and its levels are increased in clinical situations marked by endothelial proliferation or damage.

In cancer patients, besides being an angiogenic marker, von Willebrand factor contributes directly to metastases production, by promoting binding of

tumor cells to platelets. Such interaction results in heterotypic cell aggregates, which are not recognized by the immune system and are more capable to adhere to capillary beds of the reached organs.

In the present study, von Willebrand factor plasma levels were compared between a group of 75 patients with colorectal adenocarcinoma and a group of 88 health controls, being these values correlated with main prognostic markers of the disease.

Patients had higher plasma levels than controls, and the difference reached statistical significance. There was a significant association among von Willebrand factor concentrations and tumor staging, adjacent anatomical structures invasion and distant metastases.

The study results indicate that von Willebrand factor plasma levels in patients with colorectal adenocarcinoma may represent an important indicator of tumor biological behavior. The role of the protein in metastatic process reinforces this statement and its increase among cancer patients may have influence in the disease evolution.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coleman M. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon: IARC,1993.
2. American Cancer Society. Cancer facts and figures, 1996. Atlanta: American Cancer Society, 1996; publication no.5008-96.
3. Parker SL. Cancer Statistics , 1996. CA Cancer J Clin. 1996; 65:55.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da Incidência da Mortalidade por Câncer no Brasil para 1999. Rio de Janeiro: INCA, 1999.

5. Fletcher CD. Diagnostic Histopathology of Tumors. Churchill New York: Livingstone 1995; 1: 260.
6. Wilmink ABM. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. Dis. Colon Rectum 1997; 40: 483-93.
7. Dukes CE, Bussey HJR. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. Br J Cancer 1958; 12: 309-20.
8. Wolmark N, Fischer B, Wieand HS. The prognostic value of the modifications of the Dukes 'C' class of colorectal cancer : analysis of the NSABP trials. Ann Surg 1996; 302: 115-22.
9. Tomisaki SI, Ohno S, Ichiohi I et al. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. Cancer 1996; 77: 1722-28.
10. Minsky B. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum II. The influence of blood vessel invasion. Cancer 1988; 61: 1417-24.
11. Philips RKS, Hittinger R, Blesovsky L. Surgical pathology and its relationship to survival. Br J Cancer 1984; 71: 604-10.
12. Nicholls RJ, Dozois RR. Surgery of Colon and Rectum. New York: Churchill Livingstone 1997; 22: 415.
13. Kwenter J, Bjorg S, Haglin E et al . Screening and recreening for colorectal cancer: a control trial of faecal occult blood testing in 27.700 subjects. Cancer 1988; 62:645-51.
14. Gutman M, Fidler Jf. Biology of human colon cancer metastasis. World J Surg 1995; 19:226-34.
15. Moertel CG, Fleming Tr, Macdonald JS et al. Levamisole and fluoracil for therapy of resected colon carcinoma. N Engl J Med 1990; 322:352.
16. Cromwell JW, Aguilar JC. The molecular basis of cancer metastasis. Sem Colon & Rectal Surg 1998; 9;1:53-62.
17. Morson BC, Dawson IMP. Gastrointestinal Pathology. Oxford: Blackwell Scientific 1972.
18. Hart IR, Saini A . Biology of tumor metastasis. The Lancet 1992; 399:1453-57.
19. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley P, Israel MA. The Molecular Basis of Cancer. Philadelphia: W.B Saunders 1995: 206-32.
20. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med 1995; 333: 1757-63.

21. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastasis following tumor implantation. *Cancer Res* 1974; 34: 997-1004.
22. Frank RE, Saclarides TJ, Leugerman S et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222:695-99.
23. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57:1043-46.
24. Zhou Q, Zhao Y, Xu C et al. Increase in plasma thrombomodulin and decrease in plasma von Willebrand factor after regular radiotherapy in patients with cancer. *Thromb Res* 1992; 68: 109-18.
25. Hodak E, Tratner A, David M et al. Quantitative and qualitative assessment of plasma von Willebrand factor in classic Kaposi's sarcoma. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28.2: 217-21.
26. Penneys NS, Kott-Blumenkrans K, Cirantos F et al. Von Willebrand factor antigen levels in Kaposi's Sarcoma. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 1214-7.
27. Girma JP, Meyer D, Pannekock H et al. Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood* 1987; 70.3: 605-11.
28. Handin B, Wagner DD. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Prog Hemost Thromb* 1989; 9: 233-59.
29. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982; 95: 355-60.
30. Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor: relationship to von Willebrand disease. *Mayo Clin Proc* 1991; 66: 847-61.
31. Lethagen SR. Pathogenesis, clinical picture and treatment of von Willebrand disease. *Ann Med* 1995; 27:641-51.
32. Ewald GA. Distúrbios da Hemostasia. In: Ewald GA, McKenzie CR. *Manual de Terapêutica Clínica*. Rio de Janeiro: MEDSI; 1996: 435-459.
33. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 1987; 70:895-904.
34. Rodeghiero F, Gastman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1983; 69: 454-9.

35. Bern MM, Klumper DI, Wheler WE et al. Factor VIII complex in chronic renal failure: influence of protein C, fibrinolysis and diabetes mellitus. *Thromb Res* 1983; 31: 177-86.
36. Lufkin EG, Fass DN, O'Fallon WV et al. Increased von Willebrand factor in diabetes mellitus. *Metabolism* 1979; 28: 63-6.
37. Pottinger BE, Read RC, Paleolog EM et al. Von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res* 1989; 53: 387-94.
38. Mazzone D, Fichera A, Pratico G et al. Factor VIII and factor VIII-related antigen in infants with viral bronchiolitis. *N Engl J Med* 1984; 311: 1257-8.
39. Gordon JL, Pottinger BE, Woo P et al. Plasma von Willebrand factor antigen in connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 441-7.
40. Giustolise R, Musso R, Cacciola E et al. Abnormal plasma level of factor VIII / von Willebrand factor complex in myocardial infarction: expression of acute phase reaction or index of vascular endothelium damage? *Thromb Haemost* 1984; 51: 408.
41. Castillo R, Maragall A, Rodes J et al. Increased factor VIII complex and defective ristocetin-induced platelet aggregation in liver disease. *Thromb Res* 1977; 11: 899-906.
42. Sweeney JD, Labuzetta BS, Hoerning LA et al. Platelet function and ABO blood group. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 79-81.
43. Ohtani H, Nagura H. Differing microvasculature in the two major types of gastric carcinoma: a conventional, ultrastructural and ultrastructural immunolocalization study of von Willebrand factor. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990, 417: 29-35.
44. Zanetta L, Marcus Sg, Vasile J et al. Angiogenesis factors upregulate endothelial cell expression of von Willebrand factor. *Proc Am Cancer Res* 1998; 39: 40.
45. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45: 773.
46. Gasic GJ, Gasic TB, Galanti Net al. Platelet-tumor cell interactions in mice. The role of platelets in spread of malignant disease. *Int J Cancer* 1973; 11:704-18.
47. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci* 1968; 61:46-52.
48. Marcum JM, McGill M, Batisda E et al. The interaction of platelets, tumor cells and vascular subendothelium. *J Lab Clin Med* 1980; 96: 1046-53.

49. Hara Y, Steiner M, Baldini MG. Characterization of the platelet-aggregating activity of tumor cells. *Cancer Res* 1980; 40:1217-22.
50. Poggi A, Pollentarutti N, Donati MB et al. Blood coagulation changes in mice bearing Lewis lung cancer. *Cancer Res* 1977; 37: 1207-10.
51. Gasic GJ, Gasic TB, Jimenez AS. Platelet-aggregating activity in mouse tumor cells. Removal and regeneration. *Lab Invest* 1977; 36:413-19.
52. Mehta P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood* 1984; 63: 55-63.
53. Pearlstein E, Ambrogio C, Gasic GJ et al. Inhibition of the platelet-aggregating activity of two human adenocarcinomas of the colon and an anaplastic murine tumor with a specific thrombin inhibitor, dansilarginine n-(3-ethyl-1,5-pentanidil)amida. *Cancer Res* 1981; 41: 4535-39.
54. Mehta P, Springfield D, Ostrowski N. Arterial prostacyclin is decreased in patients with malignant bone tumors. *Cancer* 1983; 52: 1297-300.
55. Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Touseau's syndrome revisited. *Blood* 1983; 62: 14-31.
56. Grossi IM, Hatfield LA, Newcombe M et al. Role of tumor cell glycoproteins immunologically related to glycoproteins Ib and IIb/IIIa in a tumor cell-platelet and tumor cell-matrix interactions. *FASEB J* 1988; 8: 2385-95.
57. Lerner WA, Pearlstein E, Ambrogio C et al. A new mechanism of tumor induced platelet aggregation. Comparison with mechanisms shared by other tumors with possible pharmacologic strategy toward prevention of metastasis. *Int J Cancer* 1983; 31: 463-9.
58. Gasic GJ. Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1984; 3: 99-114.
59. Sanches J, Baker V, Miller DM. Basic mechanism of metastasis. *Am J Med* 1986;292: 376-85.
60. Jamieson GA. Mechanisms of interaction between platelets and tumor cells using homologous human systems. In: Muszback LO. *Hemostasis and cancer*. Boca Raton: CRC Press 1987: 179-95.
61. Karpatkin S, Pearlstein E, Ambrogio C et al. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasi in vivo. *J Clin Invest* 1988: 81(4): 1012-19.
62. Boukerche H, Vergnes OB, Tabone E et al. Platelet-melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1989; 74: 658-63.

63. Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F et al. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J Clin Invest* 1991; 87: 229-36.
64. Nierodzik ML, Kajumo F, Karpatkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res* 1992; 52: 3267-72.
65. Nierodzik ML, Klepfish A, Karpatkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor in vitro and metastasis in vivo. *Thromb Haemost* 1995; 74:282-90.
66. Levine JD, Harlan LA, Harker ML et al. Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Blood* 1982; 60: 531-34.
67. Ribes JA, Francis CW, Wagner DD. Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. *J Clin Invest* 1987; 79: 117-23.
68. Floyd CM, Irani K, Kind PD et al. Von Willebrand factor interacts with malignant hematopoietic cell lines: evidence for the presence of specific binding sites and modification of von Willebrand factor structure and function. *J Lab Clin Med* 1992; 119:467-76.
69. Galnick HR. Von Willebrand factor, integrins, and platelets: their role in cancer. *J Lab Clin Med* 119:444-47.
70. Morganti M, Mittermayer C, Henze U et al. Expression of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor in the supernatant of endothelial cell cultures in response to the seeding of adenocarcinoma cell line HRT-18. *Biomed Pharmacother* 1996; 50: 373-75.
71. Van der Poll T, van Deventer SJ, Pasterkamp G et al. Tumor necrosis factor induces von Willebrand factor release in healthy humans. *Thromb Haemost* 1992; 67: 623-26.
72. Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138: 213-21.
73. Oleksowicz L, Bhagwati N, DeLeon-Fernandez M. Deficient activity of von Willebrand's factor-cleaving protease in patients with disseminated malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 2244-50.
74. Ablin RJ, Bartkus JM, Gonder MJ. Immunoquantitation of factor VIII-related antigen ( von Willebrand factor antigen ) in prostate cancer. *Cancer Lett* 1988; 40: 283-89.
75. Facchini V, Gadducci A, Baicchi U et al. Factor VIIIIR: Ag plasma levels in patients with cervical and ovarian carcinoma. *Eur J Oncol* 1988; 9: 87-93.

76. Gadducci A, Baicchi U, Marrai R et al. Pretreatment plasma level of fibrinopptide-A (FPA), D-dimer (DD), and von Willebrand factor (vWF) in patients with operable cervical cancer: influence of surgical-pathological stage, tumor size, histologic type, and lymph node status. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 354-8.
77. Sweeney JD, Killion KM, Pruet CF et al. Von Willebrand factor in head and neck cancer. *Cancer* 1990; 11: 2387-89.
78. Paczuski R, Bialkowska A, Kotschy M et al. Von Willebrand factor in plasma of patients with advanced stages of larynx cancer. *Thromb Res* 1999; 95: 197-200.
79. Zimmerman TS, Hoyer LW, Dickinson L et al. Determination of the von Willebrand's disease antigen (factor VIII related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis. *J Lab Clin Med* 1975; 86:152-159.
80. Dukes CE. The classification of cancer of rectum. *J Pathol* 1932; 35: 323-332.
81. Turnbull RB, Jr. Kyle K, Watson FR et al. The influence of non touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg* 1967; 166:420-427.
82. Aillaud MF, Pignol F, Alessi MC et al. Increase in plasma concentration of plasminogen activator inhibitor, fibrinogen, von Willebrand factor, factor VIII:C and in erythrocyte sedimentation rate with age. *Thromb Haemost* 1986; 55: 330-332.
83. Conlan MG, Folsom AR, Finch A et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, Sex, and risk factors for atherosclerosis. The atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost* 1993; 70:380-385.
84. Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 1992; 79: 608-613.
85. Gordon PH. Malignant neoplasms of the colon. In: Gordon PH, Nivatvongs S. *Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus*. Saint Louis: QMP 1999: 575-717.
86. Wolmark N, Fischer B, Wieand HS et al. The relationship of depth of penetration and tumor size to number of positive nodes in Dukes' C colorectal carcinoma. *Cancer* 1984; 53: 2707-2712.
87. Newlands RC, Dent OF, Lyttle MNB et al. Pathologic determinants of survival associated in colorectal cancer associated with lymph nodes metastasis. *Cancer* 1994; 73: 2076-2082.
88. Steele G, Zamcheck N. The use of carcinoembryonic antigen in the clinical management of patients with colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 1985; 8: 421-427.

89. Wolmark N, Fischer B, Wieand HS et al. The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NSABP clinical trials. *AnnSurg* 1984; 199: 375-382.
90. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL et al. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 603-611.
91. Devesa JM, Morales V, Enriquez JM. Colorectal cancer: The basis of a comprehensive follow up. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 636-652.
92. Minton JP, Hoehn JL, Gerber Dm et al. Results of 400 patient carcinoembryonic antigen second-look colorectal cancer study. *Cancer* 1985; 55: 1284-1290.
93. Newlands RC, Dent OF, Chapuis PH et al. Survival after curative resection of lymph nodes negative colorectal carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 564-571.
94. Schwartzmann G. EORTC strategies for anticancer drug discovery. *Forum Trends in Experimental and Clinical Medicine* 1992; 2: 520-528.
95. Workman P, D'Incalci, Berdel WE et al. New approaches in cancer pharmacology; drug design and development. *Eur. J. Cancer* 1992; 28:1190-1200.
96. Van Custem E. A glimpse of the future. New directions in treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32: 23-27.
97. Schwartzmann G, Workman P. Anticancer Drug Screening and Discovery in the 1990s: A European Perspective. *Eur. J. Cancer* 1993; 29: 3-14.
98. Workman P, Kaye S B, Schwartzmann G. Laboratory and phase I studies of new cancer drugs. *Current Opinion Oncol*, 1992; 4:1065-1072.