

ANGIOGÉNESE E CANCRO

da biopatologia à terapêutica

BRUNO GRAÇA, CARLA LUNET, ANA SOFIA COELHO, GISELA MONTEIRO, PAULO FREIRE,
ANDREIA SPEIDEL, LINA CARVALHO

Instituto de Anatomia Patológica. Faculdade de Medicina de Coimbra. Coimbra.

RESUMO

A angiogénese é um factor determinante no crescimento das neoplasias epiteliais, podendo ser utilizada no estudo da progressão para a malignidade e metastização. As células neoplásicas têm capacidade de produzir factores angiogénicos que progressivamente ultrapassam a capacidade antiangiogénica de algumas células do sistema imunitário. O factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais importante na angiogénese das neoplasias. No carcinoma colo-rectal está demonstrado que o aumento da expressão daquele factor no tecido neoplásico, acompanha a evolução das alterações genéticas e também a progressão local. Para o carcinoma bronco-pulmonar de células não pequenas, nomeadamente na evolução do carcinoma epidermóide, a angiogénese é um marcador histológico da forma angiogénica da displasia epidermóide que evolui para carcinoma. Nas neoplasias invasivas, tanto do aparelho respiratório como do estômago, as moléculas de acção estromal: COX 2, metaloproteinases e moléculas de adesão, aceleram o processo de angiogénese sendo a sua determinação importante para o prognóstico e conhecimento de acção terapêutica. No carcinoma da mama há correlação entre o aumento da densidade microvascular, a expressão de VEGF e as alterações do p53, permitindo prever o prognóstico. Nos sarcomas, o VEGF pode ser utilizado como marcador serológico de acompanhamento clínico pós-operatório mas a angiogénese tumoral ainda não permitiu conhecer os mecanismos de metastização vascular.

Palavras chave: angiogénese; carcinoma colo-rectal; carcinoma bronco-pulmonar; carcinoma gástrico; carcinoma mamário; sarcoma.

SUMMARY

ANGIOGENESIS AND CANCER: FROM BIOPATHOLOGY TO THERAPY

Angiogenesis is an important factor in the development of epithelial neoplasias and is useful in the study of progression and metastasis. Neoplastic cells produce angiogenic factors that overtake the antiangiogenic capacity of autoimmune cells. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important factor in the neoplastic angiogenesis. In colo-rectal carcinoma the expression of VEGF is parallel with genetic alterations and Duke's grade. In non-small cell lung carcinoma it is possible to define the angiogenic squamous dysplasia that evolves to invasive epidermoid carcinoma. In invasive gastric and lung cancer, the stromal molecules: COX 2, metalloproteinase and adhesion molecules develop angiogenesis and their validation is important either in

prognosis and therapy. In breast cancer there is a correlation between the growing of microvessels density, VEGF expression and p53 alterations, pointing to prognosis. Serological values of VEGF may also be used to monitorise the follow up of sarcomas and its recurrence but vascular metastatic process is not yet completely understood.

Keywords: angiogenesis; colo-rectal carcinoma; lung carcinoma; gastric cancer; breast carcinoma ; sarcoma.

INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são, depois das doenças cardio-vasculares, a segunda causa mais comum de morte nos países industrializados, e a disseminação metastática é a responsável pelo fracasso da terapêutica. A angiogénese induzida pelo tumor proporciona disseminação vascular e dispersão neoplásica, além de possibilitar a nutrição das células malignas.

Desta forma o crescimento tumoral contínuo e o desenvolvimento de metástases depende de um passo crucial: a angiogénese. Por definição, angiogénese é o processo de formação e crescimento de novos vasos sanguíneos. A neovascularização é consequência da angiogénese. Esta capacidade não é exclusiva dos fenómenos patológicos porque outros quadros nosológicos se caracterizam pela sua capacidade angiogénica, presente desde o desenvolvimento embrionário. A angiogénese é um fenómeno fulcral no crescimento fetal, da formação da placenta até à ramificação do sistema circulatório da criança. No adulto é necessária na reparação ou regeneração tecidual, no processo de homeostase e cicatrização de feridas. Na mulher, a angiogénese é activa a nível uterino durante alguns dias do ciclo menstrual, bem como na ovulação e maturação ovocitária. A angiogénese fisiológica caracteriza-se por ser um processo regulado e com duração limitada¹⁻³.

Uma massa tumoral com diâmetro inferior a 5 mm pode receber oxigénio e nutrientes por difusão. As massas maiores que 0,5 cm requerem a proliferação e morfogénese de células endoteliais vasculares¹. Até há muito pouco tempo a angiogénese era considerada como apenas ocorrendo nos tumores sólidos, mas há estudos que demonstram a importância da angiogénese nos tumores líquidos, como na leucemia mielóide aguda, no mieloma múltiplo^{4,5} e nos linfomas não-Hodgkin de células B⁶.

Em condições normais, existe um equilíbrio entre moléculas proangiogénicas e antiangiogénicas em favor destas. Quando o equilíbrio se inverte, desencadeia-se a angiogénese¹⁻³. Ao nível clínico, esta inversão no sentido da angiogénese é reconhecida pela expansão da massa

tumoral, que se torna detectável, sangra e/ou metastisa. Hematúria no cancro da bexiga, melenas no cancro colo-rectal e hemoptises no cancro do pulmão, resultam de tumores neovascularizados².

Nos tumores humanos, ao nível celular a alteração do equilíbrio supra-citado pode verificar-se por quatro mecanismos:¹ carcinomas in situ avasculares estimulam a neovascularização num território vascular adjacente – mecanismo mais comum;² percursoros de células endoteliais circulantes incorporam-se num foco angiogénico;³ células neoplásicas induzem os fibroblastos e/ou macrófagos locais a exprimirem factores angiogénicos;⁴ vasos preexistentes são permeabilizados pelas células tumorais. Pode ocorrer uma combinação destes mecanismos¹⁻³.

Ao nível molecular, a inversão do equilíbrio caracteriza-se pela produção de moléculas que regulam a angiogénese pelas células neoplásicas.

A angiogénese neoplásica é um fenómeno que se desenrola através de etapas interdependentes¹⁻³ que dependem fundamentalmente da acção de actores proangiogénicos, actores antiangiogénicos e células efectoras.

Alguns tecidos tumorais expressam de um modo constitucional factores proangiogénicos. Sabe-se que a sua síntese pode ser aumentada por certos estímulos: hipóxia, baixo pH, citocinas, factores de crescimento, tamanho do tumor, oncogenes activados, transdução do sinal ou perda de função de genes supressores. Mas a síntese de factores proangiogénicos não é exclusiva de células tumorais. As próprias células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T, mastócitos) que infiltram os tumores, libertam factores angiogénicos.

No Quadro I, enumeram-se os factores pró-angiogénicos actualmente conhecidos e as respectivas propriedades e receptores.

O VEGF (vascular endothelial growth factor) é uma glicoproteína que existe em quatro isoformas. Este factor tem a capacidade de induzir um aumento da permeabilidade vascular numa ordem de grandeza 50000 vezes superior à histamina. Deste modo, permite a difusão para o interstício de proteínas que vão permitir a migração das células en-

| <i>Quadro I - Factores proangiogénicos</i> | | | |
|---|---|---|------------|
| Factor | Propriedades | Receptor | |
| Vascular endothelial growth factor - vascular permeability factor | Mitogénio endotelial, factor de sobrevivência, indutor de permeabilidade vascular | Flk-1/KDR (VEGFR-2), Flt-1 (VEGRF-1) | |
| Placental growth factor | Mitogénio endotelial | Flt-1 (VEGRF-1) | |
| Basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF-2) | Mitogénio endotelial, indutor da angiogénese | FGF-R1 - 4 | |
| Acidic fibroblast growth factor (aFGF/FGF-1) | Mitogénio endotelial, indutor da angiogénese | FGF-R1 - 4 | |
| Fibroblast growth factor 3 (FGF-3/int-2) | Mitogénio endotelial, indutor da angiogénese | FGF-R1 - 4 | |
| Fibroblast growth factor 4 (FGF-4/hst/K-FGF) | Mitogénio endotelial, indutor da angiogénese | FGF-R1 - 4 | |
| Angiopietina-1, 2 (Ang) | Indutor da angiogénese | Tie-2 | |
| Transforming growth factor- α (TGF- α) | Mitogénio endotelial, indutor da angiogénese; indutor da expressão de VEGF | Epidermal growth factor-R | |
| Epidermal growth factor (EGF) | Mitogénio endotelial; indutor da expressão de VEGF | Epidermal growth factor-R | |
| Hepatocyte growth factor / scatter factor (HGF/SF) | Mitogénio endotelial, indutor da angiogénese | c-Met | |
| Transforming growth factor- β (TGF- β) | Indutor da angiogénese, inibidor do crescimento endotelial, indutor da expressão de VEGF | Transforming growth factor- β - RI, II, III | |
| Tumor necrosis factor- α | Indutor da angiogénese, mitogénio endotelial (baixas concentrações) ou inibidor (altas concentrações), indutor da expressão de VEGF | TNF-R55 | |
| Platelet-derived growth factor | Indutor da angiogénese, mitogénio e factor de motilidade para células endoteliais e fibroblastos | Platelet-derived growth factor-R | |
| Granulocyte colony-stimulating factor | Indutor da angiogénese, actividade mitogénica e motogénica para células endoteliais | Granulocyte colony-stimulating factor - R | |
| Interleucina-8 | Indutor indirecto da angiogénese | IL-8R presente em células endoteliais (?) | |
| Pleiotropin | Factor de crescimento pleotrópico | Proteoglicano | |
| Timidina fosforilase (TP) - platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) | Factor angiogénico | Desconhecido | |
| Angiogenina | Indutora da angiogénese com actividade RNase | 170-kD receptor | angiogenin |
| Proliferina | Proteína indutora da angiogénese no rato | Desconhecido | |

doteliais. O receptor de VEGF é expresso quase exclusivamente pelas células endoteliais¹⁻³.

O FGF (fibroblastic growth factor) a e b estimulam a mitose e migração das células endoteliais, sendo uma das proteínas angiogénicas mais potentes. FGFb não é um mitogénio endotelial específico mas também actua sobre fibroblastos, células musculares lisas e neurónios¹⁻³.

A família da angiopietina é formada por quatro elementos, dos quais dois estão bem caracterizados. A Ang-1 é um factor proangiogénico que actua sobre as células endoteliais modulando as interacções celulares e promovendo a diferenciação celular⁷. A Ang-2 liga-se ao mesmo receptor da Ang-1. Pensava-se que exercia uma acção antagonista sobre o receptor citado. Actualmente suspeita-se que a sua acção seja proangiogénica⁸.

A descoberta de inibidores da angiogénese veio colocar a hipótese da sua utilização como arma terapêutica. A

possibilidade destes factores pararem ou diminuírem o crescimento tumoral ou a formação de metástases tem sido uma das principais áreas de investigação em Oncologia. Estão citados no Quadro II.

Quadro II - Inibidores da angiogénese

| Nome |
|--|
| Trombospondina-1 e fragmentos internos de trombospondina-1 |
| Endostatina |
| Angiostatina |
| Vasostatina |
| Vascular endothelial growth factor inhibitor |
| Fragmento do factor plaquetar-4 |
| Derivado de prolactina |
| Restin |
| Proliferin-related protein |
| SPARC cleavage product |
| Osteopontin cleavage product |
| Interferon- α - β |
| METH-1 e METH-2 |
| Angiopietina-2 |
| Fragmento de antitrombina III |
| Interleucina-10 |

A angiogénese tumoral não é um fenómeno que escapa ao sistema imunitário. Pelo contrário as próprias células do organismo humano intervêm activamente no processo. Linfócitos T, B, macrófagos e mastócitos estão associados, em alguns tumores, à angiogénese⁹⁻¹³.

Outras moléculas intervêm na angiogénese, como: integrinas, que actuam como receptores para fragmentos de fibronectina e outros componentes da matriz extracelular² efrinas, que especificam o sentido arterial ou venoso do desenvolvimento vascular³ ciclooxigenase 2 (COX 2), cuja produção é estimulada por FGFb, sintetisa prostaglandina E2, um estimulador da angiogénese;⁴ inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1), que restringe a proteólise a um evento local na extremidade dos vasos angiogénicos⁵ sintetase do óxido nítrico, que através da síntese de NO induz vasodilatação no leito vascular, pré-requisito para a formação do neovaso¹⁻³.

Está cientificamente provado que existe uma ligação entre as bases genéticas dos cancros e a angiogénese tumoral. Achados recentes apontam para que mutações no gene p53 induzam a expressão de factores proangiogénicos.

nicos, como o VEGF¹⁴⁻¹⁸ e ou reduzam a expressão de factores antiangiogénicos, como a TSP (thrombospondin stimulating protein) 1¹⁹. Determinadas mutações no gene H-ras podem estar implicadas na angiogénese, ao aumentar a produção de VEGF²⁰.

O estudo da angiogénese levanta novas possibilidades em Oncologia: factores de prognóstico, marcadores tumorais, técnicas imagiológicas e modalidades terapêuticas.

Numerosos estudos demonstram correlação entre a extensão da angiogénese (manifestada pela densidade microvascular - DM) e a probabilidade de metastização, sendo esta um importante factor de prognóstico. Os tumores com maior densidade vascular e com maior número de microvasos apresentam maior capacidade metastática, maior actividade proliferativa, menor diferenciação histológica e maior massa tumoral²⁰⁻²⁶. No entanto esta correlação não é constante. Existem importantes variações entre os vários tumores. Também o doseamento dos factores angiogénicos circulantes parece fornecer informações adicionais sobre o prognóstico, predizer a resposta à terapêutica e monitorizar o curso clínico em alguns tumores^{27,28}.

Os factores angiogénicos actuam sobre receptores específicos. Actualmente desenvolvem-se técnicas utilizando anticorpos marcados contra esses receptores específicos. Deste modo é possível determinar quantitativamente a expressão dos receptores, sugerindo uma associação entre esta expressão e o tipo histológico da neoplasia e também obter resultados terapêuticos²⁹.

No campo da terapêutica, as investigações evoluem em duas vertentes: ajuste dos protocolos de tratamento dos tumores, com base nos dados obtidos a partir do estudo da estrutura microvascular dos tumores e desenvolvimento de terapêuticas antiangiogénicas específicas. As aplicações terapêuticas incluem o desenvolvimento de novas substâncias antiangiogénicas, fármacos que actuam nos neovasos, terapêutica baseada em anticorpos e terapia génica.

A associação de terapêutica antiangiogénica com fármacos citotóxicos parece promissora³⁰. Alguns fármacos citotóxicos exercem em parte a sua acção inibindo a proliferação das células endoteliais. As células endoteliais em proliferação e em migração sofrem efeito da quimioterapia antes das células neoplásicas. As células endoteliais recuperam durante as 2-3 semanas de pausa da quimioterapia para permitir a recuperação da medula óssea. Este endotélio pode resuprir células tumorais residuais com novos vasos e factores parácrinos necessários à sobrevivência das células neoplásicas. Isto leva à recidiva do tumor, obrigando a reformular a quimioterapia, levando à

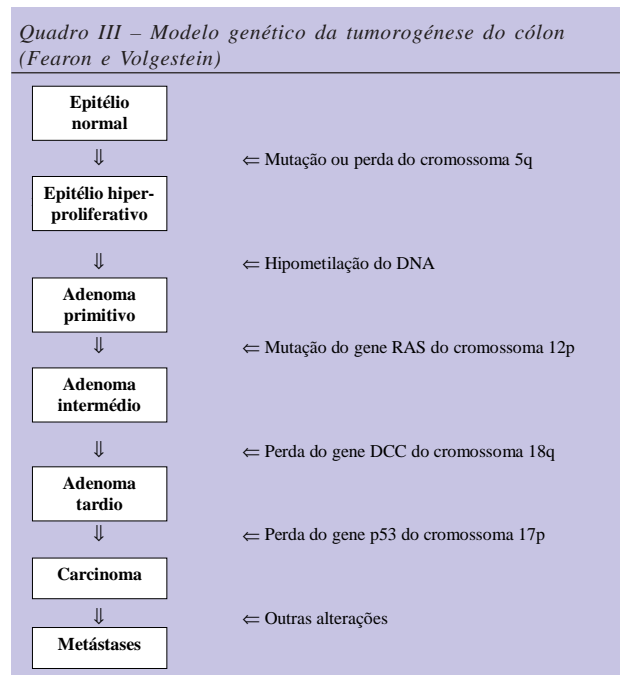
emergência de células tumorais quimiorresistentes (mas não células endoteliais). Deste modo, começa a defender-se que a quimioterapia e a radioterapia sejam utilizadas em doses inferiores, mas durante períodos de tratamento mais longos^{1,2}.

De acordo com a sua frequência, importa conhecer de um modo mais aprofundado, qual o papel e implicações da angiogénese em alguns tumores: carcinoma colo-rectal, carcinoma do pulmão, carcinoma do estômago, carcinoma da mama e sarcomas, segundo a respectiva biopatologia.

CARCINOMA COLO-RECTAL

O carcinoma colo-rectal é um dos tumores malignos mais frequentes nos países ocidentais. Em Portugal alcançou actualmente uma incidência similar à dos países mais desenvolvidos, sendo a neoplasia maligna mais frequente.

O desenvolvimento do carcinoma do cólon ocorre através de uma série de alterações genéticas, envolvendo a activação de oncogenes e a perda de genes supressores. A acumulação progressiva de alterações genéticas (ex: APC, p53, DCC e ras) permitem conhecer a evolução do adenoma e a sua transformação maligna (Quadro III).



Demonstrou-se que o desenvolvimento de vasos sanguíneos ao redor e dentro do tumor sólido é indispensável para o crescimento tumoral, invasão local e metastização para órgãos vizinhos. A densidade microvascular nos adenomas é significativamente superior à existente nos tecidos normais e inferior à dos carcinomas, concluindo-

-se que a angiogénese acompanha o desenvolvimento tumoral³¹.

Alguns factores envolvidos na angiogénese do carcinoma permitiram as conclusões seguintes:

- VEGF: como factor angiogénico potente que é, facilita o crescimento dos tumores do cólon. Pacientes com carcinoma colo-rectal possuem níveis superiores de VEGF comparativamente a indivíduos saudáveis. Estes níveis são superiores nos pacientes com estágio de Dukes D, comparativamente aos estádios de Dukes A, B, C (cujos valores eram semelhantes entre si)³².

A expressão persistente, ou a elevação do VEGF e seus receptores é importante para o desenvolvimento do carcinoma do cólon, acontecimentos observados também durante a transformação do adenoma³³.

As três isoformas do VEGF – VEGF121, VEGF165 e em menor grau VEGF189 – são expressas na mucosa do cólon que serve de controlo e nos adenomas, e este padrão de expressão é mantido nos adenocarcinomas³³. Estes resultados contrastam com os obtidos por Tokuanaga *et al* (1998), que indicaram que o VEGF189 é detectado sobretudo nos carcinomas colo-rectais de estágio avançado³³ e em relação com o estágio M1 (metástases à distância) e com pior prognóstico³⁴. Estas discrepâncias poderiam contudo dever-se às diferenças étnicas dos pacientes em estudo (Europeus vs. Asiáticos) ou a diferentes técnicas usadas³³.

O VEGF está associado ao desenvolvimento de metástases e a pior prognóstico^{32,35}. Parece ser um factor de sobrevivência das células endoteliais, uma vez que estudos efectuados demonstraram que a terapia contra o receptor do VEGF originava um aumento da apoptose das células endoteliais, seguida de um aumento da apoptose das células neoplásicas³⁵.

Têm sido identificados muitos factores que estão envolvidos na regulação do VEGF, tais como: hipoxia, gene *srs*, *ras* e *p53*, factores de crescimento específicos e citocinas³⁶.

- Angiopoietinas (Ang): Ang-1 e Ang-2 são reguladores importantes da sobrevivência das células endoteliais. Utilizando peças cirúrgicas de pacientes com carcinoma do cólon, demonstrou-se que a expressão da Ang-2 é superior à da Ang-1. Este desequilíbrio poderá induzir a destabilização dos vasos sanguíneos e, na presença do VEGF, poderá aumentar a angiogénese e o crescimento dos tumores do cólon³⁷. As angiopoietinas são produzidas pelas células tumorais e pelas células peritumorais, facto que valoriza a hipótese da angiogénese tumoral envolver uma relação dinâmica entre células

endoteliais/pericitos e células tumorais.

- Trombospondina 1 (TSP-1) e Trombospondina 2 (TSP-1 e TSP-2):

Tumores que são TSP-1 negativos, possuem maior densidade microvascular, maior risco de metastização hepática do carcinoma do cólon e pior prognóstico, relativamente aos TSP-1 positivos. TSP-1 é um factor antiangiogénico, que poderá ser útil para prever a recidiva do carcinoma do cólon³⁸.

Outro estudo revelou que, dos cancros analisados, 62,3 % eram TSP-2 positivos e que a incidência de metástases hepáticas era inferior aos TSP-2 negativos. Os carcinomas TSP-2 negativos/VEGF -189 positivos, mostraram ter um aumento do número e densidade dos vasos do estroma, bem como um pior prognóstico, comparativamente aos TSP-2 positivos/VEGF -189 negativos. Isto sugere que as metástases do carcinoma do cólon são determinadas pela angiogénese, e que esta resulta de um balanço entre o factor TSP-2 (anti-angiogénico) e o factor VEGF-189 (angiogénico)³⁹.

A expressão da TSP-1 e TSP-2 é estimulada pela presença de interleucina 10 (IL-10) (40).

- Genes que influenciam os níveis dos factores pro e anti-angiogénicos:

O gene *p53* é um gene supressor tumoral, que está envolvido na regulação da angiogénese. A perda deste gene conduz à diminuição dos factores que inibem a angiogénese; estudos revelaram que a perda do *wild type* *p53* leva a uma diminuição na secreção da trombospondina nos fibroblastos. Alguns estudos sugerem que o gene *p53* está envolvido na regulação da expressão de VEGF. A reintrodução de wt-*p53* nas células do carcinoma do cólon provoca diminuição da expressão do VEGF RNA e da secreção de VEGF, o que está associado com uma inibição da angiogénese *in vivo*⁴¹.

Uma vez que os tecidos hiperplásicos podem exprimir níveis elevados de moléculas angiogénicas, efectuou-se um estudo⁴² para determinar se a mucosa adjacente ao adenocarcinoma do cólon podia contribuir para a angiogénese. Para tal, foram examinados o índice proliferativo e de expressão das moléculas angiogénicas e as densidades vasculares de 74 peças operatórias em carcinomas do cólon e nos tumores induzidos pela implantação intracecal de células malignas em murinos, com potenciais metastáticos diferentes. Os resultados deste estudo revelaram que:

- os carcinomas do cólon humanos podem induzir hiperplasia na mucosa adjacente ao tumor;
- os tecidos hiperplásicos podem exprimir um número

elevado de moléculas angiogénicas, o que explica o facto dos tecidos normais peri-tumorais serem altamente vascularizados;

- a extensão da hiperplasia e a produção de moléculas angiogénicas estava directamente relacionada com o potencial metastático das células.

O desenvolvimento de drogas antiangiogénicas poderá ser promissor no tratamento do cancro do cólon, podendo inibir a sua progressão e a recidiva das metástases:

- DC101 – É um anticorpo monoclonal que, se liga a *flk-1* (receptor do VEGF), bloqueando a ligação deste com o VEGF *in vitro*;

O DC101 poderá prolongar a vida de pacientes com carcinoma do cólon³⁵.

- C225 – É um anticorpo monoclonal, que se liga directamente ao receptor ECF. Os seus efeitos não são consensuais em diferentes estudos realizados. Alguns estudos, utilizando C225 *in vitro*, demonstraram que induzia a apoptose das células tumorais no cancro do cólon humano. Contudo, outros estudos, utilizando C225 em modelos de cancro do cólon *in vivo*, não mostraram haver apoptose significativa das células tumorais e epiteliais (esta discrepância de resultados poderá resultar das diferenças nos modelos tumorais estudados). Estes últimos estudos revelaram, porém, que a associação do C225 ao DC101 vai potenciar o efeito deste último, elevando a apoptose das células tumorais e das células endoteliais, diminuindo a angiogénese, bem como a formação de ascite⁴³.

A associação do DC101 com o C225 constituirá uma nova estratégia terapêutica para o cancro peritoneal do cólon⁴³.

- SU5416 – inibidor do receptor tirosina cinase, *Flk-1/KDR* (VEGF-2), que é o receptor do VEGF.
- SU6668 – inibidor do receptor tirosina cinase, para o VEGF, bFGF, PDGF

CARCINOMA BRONCO-PULMONAR

O carcinoma bronco-pulmonar constitui actualmente a principal causa de morte por cancro no Mundo Ocidental, sendo as suas principais causas o tabagismo e a exposição prolongada a carcinogénios e co-carcinogénios poluentes ambientais⁴⁴. Em Portugal sucede ao carcinoma colo-rectal.

A sua incidência tem vindo a aumentar cerca de 0,5% ao ano, sobretudo a nível dos países desenvolvidos⁴⁵, mais frequente no sexo masculino, com a incidência no sexo feminino subindo por aumento dos respectivos hábitos tabágicos.

O carcinoma do pulmão divide-se em diversos sub-tipos histológicos, sendo clássica a sua divisão, para abordagem e tratamento destes pacientes, em carcinoma de células pequenas (CPCP) e carcinoma de células não pequenas (CPCNP), que compreende o adenocarcinoma, o carcinoma epidermóide (ou carcinoma de células escamosas) e o carcinoma de células grandes, como grupos gerais.

A angiogénese na neoplasia pulmonar, está implicada como factor de desenvolvimento, manutenção e crescimento tumoral, e como factor independente de prognóstico, em estudos realizados em pacientes com CPCNP.

O papel da angiogénese no desenvolvimento do cancro do pulmão está documentado em mais de 100 citações⁴⁶. A angiogénese ocorre precocemente durante o processo de malignização, a displasia brônquica e o carcinoma *in situ*, possuem uma vascularização aumentada relativamente a lesões histológicas reactivas, não neoplásicas e reversíveis, como a hiperplasia e a metaplasia epidermóide.

A importância atribuída ao papel da angiogénese nesta sequência de alterações pré-neoplásicas, varia consoante os diversos sub-tipos histológicos do carcinoma bronco-pulmonar.

Na evolução do carcinoma epidermóide, foi descrita uma lesão pré-neoplásica específica - a displasia epidermóide angiogénica (ASD-Angiogenic Squamous Dysplasia), da qual a angiogénese faz parte integral. Tratam-se de pequenas lesões em que ansas capilares se projectam no epitélio brônquico histologicamente anormal (displásico), resultando em rearranjos arquitectónicos caracterizados pela formação de lesões micro-papilares, nas quais as ansas capilares são cobertas por bandas de epitélio estratificado, normalmente epidermóide com ou sem displasia⁴⁷. Estas lesões brônquicas pré-neoplásicas foram encontradas em indivíduos com elevado risco de desenvolvimento de carcinoma pulmonar e em pacientes com carcinoma epidermóide já diagnosticado. São lesões estreitamente relacionadas com a agressão tabágica, sendo mais frequentes em indivíduos do sexo masculino e fumadores⁴⁶.

No entanto, no que respeita a uma outra larga faixa de carcinomas bronco-pulmonares, como o adenocarcinoma ou o carcinoma de células grandes, a sequência de alterações histológicas pre-neoplásicas não está ainda tão bem definida, estando o papel da angiogénese precoce igualmente pouco esclarecido⁴⁶.

Os níveis séricos e urinários de diversos factores angiogénicos são superiores em pacientes portadores de CPCNP em relação a grupos de controlo (pacientes sãos), facto que à partida nos permite estabelecer uma associa-

ção importante entre a angiogénese e a manutenção tumoral⁴⁸.

- VEGF - o mais potente e específico factor promotor angiogénico a nível dos CPCNP e a capacidade das células tumorais produzirem VEGF leva a uma maior resistência à apoptose (morte celular programada) e consequentemente facilita a proliferação e crescimento tumorais.

Níveis elevados de VEGF e dos seus receptores de tirosina-quinase (KDR e flk-1) foram encontrados em pacientes com CPCNP, estando esses níveis positivamente correlacionados com a densidade microvascular (MVD) e a contagem microvascular (M C) nos cortes histológicos.

Estudos genéticos demonstraram nos CPCNP, a presença de mutações do oncogene *ras* que conduzem a sobre-regulação do VEGF e de mutações a nível do gene p53 que conduzem igualmente a um aumento da expressão do VEGF⁴⁸.

Diferentes tipos histológicos de CPCNP expressam diferentes níveis de VEGF, tendo-se encontrado níveis relativos superiores nos adenocarcinomas.

De um modo geral, não foram encontradas correlações significativas entre a expressão do VEGF e a idade, sexo e estádios tumorais⁴⁹.

- PDEGF é promotor da angiogénese nos CPCNP, sobretudo nos carcinomas epidermóides, havendo uma associação positiva com a MVD⁴⁸. O PDEGF/TP (thymidine phosphorylase) pode apresentar maiores concentrações nos adenocarcinomas, revelando ainda maiores concentrações nos CPCNP em relação aos CPCNP, sugerindo que estes dois grandes tipos de cancro do pulmão utilizam vias distintas para a angiogénese⁵⁰.

Vários tumores sólidos, incluindo o CPCNP, apresentam níveis elevados do FGFb e dos seus receptores⁴⁸.

- HGF – tem níveis aumentados no CPCNP, associados a pior prognóstico, sobretudo nos estádios mais avançados⁴⁸.
- TF (Tissue Factor) - é um iniciador primário da cascata da coagulação e a sua expressão correlaciona-se com a angiogénese tumoral e com a expressão do VEGF no CPCNP⁴⁸.
- HB-GAM (Heparin-binding Growth-associated Molecule) é um factor funcionalmente semelhante ao FGFb e actua como um promotor da angiogénese em algumas linhas celulares de CPCNP⁴⁸.
- IL-8 - recentemente apontada como um importante factor angiogénico, quer *in vitro*, quer *in vivo*, a expressão do mRNA da IL-8 encontra-se significativamente aumentada a nível do tecido tumoral. Esta elevada expressão parece correlacionar-se com elevados níveis

de MDV tumoral e com a angiogénese, assim como com a progressão tumoral e a sobrevida do paciente com CPCNP, independentemente do tipo histológico⁵¹.

- IL-10 (Interleucina-10) - correlação positiva significativa com os níveis das Angiopoietinas e com o seu receptor (Tie-2), podendo estar envolvida na angiogénese como factor promotor da vascularização estromal pelas células tumorais dos CPCNP⁴⁸.
- Intensidade aumentada da expressão das angiopoietinas, sobretudo da Ang-2, a nível dos vasos tumorais, sugere que a actividade concomitante das angiopoietinas e do VEGF pode ser importante na indução da angiogénese tumoral no CPCNP⁵².
- ELR-CXC (Epithelial-neutrophil Activating Peptide) considerado como angiogénico no CPCNP⁴⁸.
- TNF- α (Tumor necrosis factor- α) em concentrações elevadas inibe a proliferação das células endoteliais *in vitro* (48). Há uma associação directa entre o TNF- α e o gene *bcl-2* e uma associação inversa entre o TNF- α e a DM; o TNF- α e o TGF- β parecem demonstrar efeitos tumorigénicos em diversos tumores sólidos, incluindo o carcinoma bronco-pulmonar⁵³.
- A expressão tumoral dos TIMP-1 e TIMP-2 (Tissue Inhibitors of Metaloproteinasas) parece estar associada a um pior prognóstico no CPCNP e o aumento da sua expressão pode ocorrer como resposta a um aumento das MMPs (Matrix Metaloproteinasas)⁴⁸.
- Durante a migração das células endoteliais e a formação tubular capilar, as células aderem umas às outras e à respectiva membrana basal endotelial, sendo crucial neste processo a intervenção das moléculas de adesão, que se incluem em quatro famílias principais: Integrinas, Selectinas, Caderinas e a super-família das Imuno-globulinas.
- A redução da expressão da E-caderina está associada com o estádio e disseminação linfática no CPCNP e a sua diminuição correlaciona-se com a redução da expressão da α -catenina e da β -catenina, estando esta última correlacionada com a disseminação linfática e com o prognóstico do CPCNP.
- As Integrinas são essenciais na migração e formação capilar *in vitro*. A Integrina *av β 3* está envolvida na Angiogénese induzida pelo bFGF, e a Integrina *av β 5* intervém na Angiogénese induzida pelo bFGF e pelo VEGF. A expressão da Integrina *av β 3* nas células endoteliais durante a Angiogénese parece conduzir à supressão da actividade do p53 e diminuir a apoptose celular. Estudos revelaram que a expressão das *av* Integrinas está associada a elevados níveis de recidiva de CPCNP em estádio N0 (sem envolvimento ganglionar)⁴⁸.

- Os receptores dos factores de crescimento incluem-se na família erb/HER tipo I dos receptores da tirosina-quinase, sendo dois importantes membros desta família o EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) e o c-erbB-2 (ou HER-2).

Estes receptores estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular a nível dos CPCNP.

A expressão do EGFR foi associado a pior prognóstico do CPCNP. Em alguns estudos, o c-erbB-2 foi encontrado em 2-40% dos CPCNP estudados e relacionado com um pior prognóstico nos adenocarcinomas. Apesar de não se ter encontrado qualquer relação entre o c-erbB-2 e a DM, a diminuição da sua expressão parece correlacionar-se com um menor grau de angiogénese⁴⁸.

- A alteração genética mais comumente encontrada no processo de malignização do CPCNP envolve o gene p53, tendo sido já mencionadas as suas relações com a expressão do VEGF e a angiogénese, sendo de acrescentar que a diminuição da expressão do p53 conduz ao aumento da angiogénese também por diminuição da Trombospondina-1. A expressão do p53 encontra-se em lesões pré-invasivas da árvore brônquica, sugerindo que a sua mutação constitui um evento precoce na transformação maligna que conduz ao cancro do pulmão, não havendo no entanto consenso, no que respeita à sua importância como factor independente de prognóstico no CPCNP⁴⁸.
- HIF-1 α (Hypoxia-inducible Factor-1 α) é um factor com influência no controlo da vascularização tumoral, como indutor da angiogénese. A hipóxia ocorre frequentemente nos tumores sólidos devido ao aumento das necessidades em nutrientes e oxigénio por parte das células tumorais que se encontram em constante proliferação. No que respeita aos CPCNP, a hipóxia conduz habitualmente ao aumento do potencial angiogénico das células tumorais ao induzir a expressão de vários promotores da angiogénese como o HIF-1 α , o VEGF, o bFGF, o PDGF e o TF, uma vez que os tumores pulmonares contêm habitualmente extensas áreas de necrose e hipóxia⁴⁸.

A concentração dos factores promotores da angiogénese induzidos pela hipóxia a nível dos tumores pulmonares não é significativamente relevante para estimular a neovascularização tumoral, dado que no pulmão a normal densidade vascular é tão intensa *ab initio*, que as regiões hipóxicas de um tumor pulmonar serão raras⁵⁴.

A expressão da NOS 2 (Nitric oxide synthase) correlaciona-se com o nível de expressão do VEGF e com a MVD e está aumentada no adenocarcinoma e no carcinoma de células grandes relativamente ao carcinoma epider-

móide⁴⁸. Esta expressão tem sido documentada em tumores do pulmão e o papel do óxido nítrico na indução da formação capilar permanece mal elucidada, apesar de alguns estudos revelarem que este intervém na modulação da formação capilar a nível da interface celular tumoral⁵⁵.

- A expressão da COX-2 (Cyclooxygenase-2) está igualmente relacionada com os níveis de expressão do VEGF e com a MVD⁴⁸. Está associada com o aumento da angiogénese, a invasão tumoral e com a imunossupressão dos pacientes com CPCNP; a inibição genética da expressão da COX-2 tumoral diminui essa imunossupressão induzida pelo CPCNP no hospedeiro. O CD44 (receptor de superfície celular do hyaluronato) é expresso em maiores quantidades por células que expressam certos clones específicos da COX-2, nomeadamente os clones COX-2-S e o bloqueio específico do CD44 diminui significativamente a capacidade de invasão das células tumorais. Estes dados sugerem assim que a COX-2, sobretudo a dependente do CD44, intervém no processo de invasão dos CPCNP.
- O papel das trombospondinas (TSP I e II) a nível dos tumores sólidos não é uniforme, isto é, em certos tumores actuam como promotoras da angiogénese, ao passo que noutros actuam como inibidores, como é o caso do cancro do pulmão. No CPCNP o nível de expressão da TSP II é geralmente superior ao da TSP I. O bFGF inibe a secreção das TSP e a TSP I é capaz de antagonizar a estimulação do crescimento das células endoteliais induzido pelo bFGF⁵⁶.
- A sobrevida média dos pacientes com CPCNP positivos para a uPA (Urokinase) é menor em relação aos pacientes com tumores uPA negativos⁵⁷.

A angiogénese tende a ser bastante sensível mesmo a pequenas reduções dos níveis dos factores indutores da angiogénese, e futuras armas terapêuticas podem passar pelo uso de :

- Inibidores das MMP (metaloproteinases), como o *batimastat* e o *marimastat*;
- Inibidores da Uroquinase;
- Retinóides : previnem a indução da COX-2.
- Análogos da fumagilina, como o TNP-470, cuja actividade potencia a citotoxicidade da ciclofosfamida;
- Interferão- α e Interferão- γ ;
- Anti-corpos anti- Interleucina-8;
- Anti-corpos monoclonais anti-VEGF;
- Anti-corpos e outros antagonistas dirigidos contra os receptores de tirosina-quinase dos receptores do VEGF;
- Anti-corpos anti-bFGF
- Análogos da heparina que inibam os factores

angiogénicos que dela dependem para a sua ligação aos respectivos receptores.

- Agentes inibidores da COX-2, com é o caso de alguns AINES já conhecidos.
- Inibidores do PDEGF/TP

A par destes agentes farmacêuticos, existem polipeptídeos naturais, endógenos, como a Angiostatina e a Endostatina, que constituem inibidores do processo angiogénico. A Angiostatina é um potente inibidor da angiogénese, que é capaz de manter metástases num estágio microscópico latente, ao aumentar os níveis de apoptose das células tumorais, estando ainda documentado que a sua capacidade de provocar regressão tumoral é potenciada com radioterapia concomitante. A Endostatina leva à regressão do tumor primitivo, enquanto que mantém as metástases em latência. Estudos revelaram que a administração intra-muscular do gene da Endostatina leva à inibição biológica da Angiogénese sistémica. Estes estudos demonstraram também que, regra geral, os CPCNP parecem não adquirir resistência a certas drogas anti-angiogénicas, nomeadamente a Angiostatina⁴⁸.

CARCINOMA GÁSTRICO

O carcinoma gástrico é um dos tumores mais frequentes a nível mundial, mas é também um tumor onde ainda prevalecem inúmeras incógnitas no que respeita à sua evolução, crescimento, invasão e sobretudo nos locais onde é possível actuar terapêuticamente. Ocupa o terceiro lugar nas causas de morte oncológicas, em Portugal.

- A COX é uma enzima-chave na biossíntese de prostaglandinas e existem duas isoformas identificadas: COX-1 e COX-2, esta expressa pelo carcinoma gástrico. A COX-2 pode afectar a carcinogénese através de variados mecanismos, nomeadamente na biossíntese das PG, sobretudo a PGE₂, sendo-lhe também atribuído um papel na angiogénese. No estudo realizado por Uefuji K. e al⁵⁸, em pacientes pós-gastrectomizados, foi analisada a relação entre a proteína COX-2 e a elevação da PGE₂ no processo de carcinogénese e angiogénese no carcinoma gástrico. Os resultados mostraram que valores elevados de PGE₂ foram encontrados em tecidos neoplásicos que expressavam a proteína COX-2, e a principal fonte de elevação da COX-2, eram as próprias células neoplásicas, revelando provavelmente que estas células promovem a biossíntese de PGE₂, que por sua vez mostra um potente efeito imunossupressor ao inibir as células T ou a actividade natural das células Killer, o que confere uma vantagem à sobrevivência das células

neoplásicas conduzindo ao desenvolvimento do tumor; a MVD correlaciona-se com a intensidade de expressão de COX-2, talvez porque esta regula factores angiogénicos em células neoplásicas, promovendo a angiogénese tumoral⁵⁹.

Células que expressam a proteína COX-2 escapam ao processo de apoptose. Estas células têm interacções célula a célula anormais que lhes conferem propriedades invasivas⁵⁹.

Konturek PC et al avaliaram a relação entre a presença de *H. pylori* e o tumor gástrico, tendo em conta a sua relação com outros factores angiogénicos – COX-2 e gastrina⁶⁰:

1) a seroprevalência de *H. pylori* era significativamente alta em doentes com carcinoma gástrico; 2) a infecção por *H. pylori* pode contribuir para a carcinogénese gástrica via gastrina e COX-2 (a proliferação excessiva das células da mucosa pode conduzir a atrofia gástrica, mutação celular e transformação das células da mucosa em células produtoras de gastrina (que também expressam os seus receptores). A este processo pode-se ainda associar a expressão de COX-2, enzima inflamatória que permite a libertação de PGE₂⁵⁸, contribuindo para o crescimento tumoral, angiogénese e diminuição do processo de apoptose.

- A dThdPase está aumentada em vários tipos de tumores malignos e é induzida por várias citocinas, como a IL-1, TNF- α , IFN- α e IFN- γ no carcinoma gástrico⁶¹. A dThdPase está envolvida no metabolismo de nucleósidos de pirimidina, catalizando a fosforilase reversível da timidina em timina e 2-desoxirribose-1-fosfato. Esta enzima é idêntica ao factor de crescimento das células endoteliais derivado das plaquetas - *PDECGF* e tem actividade angiogénica.

Estudos efectuados com o objectivo de avaliar a relação entre a dThdPase, a angiogénese, crescimento tumoral, tamanho, invasão e prognóstico dos tumores concluíram que: 1) tumores expressando dThdPase (e simultaneamente VEGF) apresentavam MVD elevada⁶², mostrando que a dThdPase estimula a angiogénese⁶³; 2) tumores dThdPase + têm maior actividade proliferativa, dependente da angiogénese tumoral⁶³; 3) não foi encontrada relação entre a expressão de dThdPase e o tamanho do tumor, grau histológico, metástases linfáticas ou invasão venosa/ linfática; 4) a dThdPase é considerada predictiva do prognóstico dos doentes.

- A angiogénese tumoral progride através do balanço entre a regressão e o crescimento vascular do tumor. A Ang-2 (antagonista natural do receptor angiogénico Tie-2 presente nas células neoplásicas do carcinoma gástri-

co) e o VEGF, parecem ser reguladores fundamentais deste processo⁶⁴.

No estudo de Etoh T. et al⁶⁴, tumores com grande expressão de Ang-2 (Ang-2 +) mostraram mais frequentemente envolvimento vascular e estádios mais avançados, comparados com aqueles de baixa expressão de Ang-2; apresentaram também pior prognóstico (com menor taxa de sobrevivência) e menor grau de maturação dos vasos sanguíneos. Assim, sugere-se que a produção de Ang-2 (simultaneamente com o VEGF) contribua para a angiogénese tumoral pela indução de proteases nas células endoteliais e nas células tumorais da carcinoma gástrico.

- Sendo um indutor da angiogénese, o VEGF tem grande significado prognóstico (sobretudo quando expresso com a dThdPase) no carcinoma gástrico: no estudo de Kimura H. et al, houve uma correlação significativa entre a expressão positiva do VEGF e a invasão linfática, assim como, doentes com tumores dThdPase e VEGF + apresentaram maior incidência de metástases hepáticas que aqueles dThdPase e VEGF⁶⁵.
- Kitadai Y. et al⁶⁶, descobriram recentemente que o carcinoma gástrico exprime IL-8, e que o mRNA desta citocina está directamente relacionado com a actividade angiogénica do tumor; a IL-8 aumenta a tumorigenicidade e angiogenicidade por mecanismos autócrinos e parácrinos⁶⁶. A IL-8 aumenta a expressão do receptor EGF, VEGF e da própria IL-8 pelas células tumorais⁶⁷.
- No estudo realizado por Koide N. et al⁶⁸, foi avaliada a relação da alfa-fetoproteína (AFP) e o processo de angiogénese no tumor gástrico. Com este estudo foi avaliado o potencial de malignidade do tumor gástrico produtor de AFP tendo em consideração os processos de proliferação celular, apoptose e angiogénese: 1) tumores produtores de AFP têm grande actividade proliferativa; 2) o Índice Apoptótico (percentagem de células apoptóticas em 2000 células cancerígenas⁶⁸) dos tumores produtores de AFP foi significativamente mais baixo que nos não produtores; 3) a MVD foi significativamente mais elevada em tumores produtores de AFP; 4) a expressão de VEGF foi observada em todos os tumores produtores de AFP; 5) a expressão de dThdPase não foi observada nestes tumores. Os tumores gástricos produtores de AFP mostraram índice proli-ferativo maior, apoptose baixa e mais neovascularização, o que lhes conferia um comportamento mais agressivo (invasão mais avançada na parede gástrica e frequentes metástases regionais), sendo associados a evolução clínica e prognóstico piores.
- Os genes envolvidos na angiogénese e metástases têm um papel importante na progressão e infiltração do car-

cinoma gástrico:

1) Gene nm23 e E-cadherin: actuam como genes supressores e a sua expressão está mais elevada na neoplasia e nas metástases ganglionares relativamente à mucosa extraneoplásica e aos gânglios linfáticos não metastizados;

2) Inibidor da angiogénese 1 específico do tecido cerebral (*brain-specific angiogenesis inhibitor 1*): encontra-se diminuído na neoplasia e metástases ganglionares e está elevado em doentes com pior prognóstico devido a metástases à distância;

3) Inibidor tecidual da Metaloproteínase-2 (*tissue inhibitor Metalloproteinase-2*): está elevado na neoplasia relativamente à mucosa extra-tumoral⁶⁹;

4) Oncogene C-ras: este oncogene e o seu produto p21 contribuem para a regulação da angiogénese associada à elevação da produção de VEGF em carcinomas gástricos avançados, portanto tratamentos visando o oncogene ras poderão inibir o crescimento do tumor pela supressão da angiogénese⁷⁰;

5) Factor de transcrição Ets-1: tem um importante papel na invasão tumoral e na angiogénese. Tumores Ets-1 + apresentavam um pior prognóstico⁷¹.

• O bFGF- *Fibroblast Growth Factor* é um factor-chave no crescimento e diferenciação celular, estando envolvido no desenvolvimento embrionário, angiogénese e tumorigénese. Até à data, quatro receptores foram já clonados: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4⁷², ainda sem valor predictivo no carcinoma gástrico.

Sabe-se que a incidência de carcinoma gástrico é maior no sexo masculino que no sexo feminino, e tal sugere que as hormonas femininas possam ter um papel potencialmente protector. No trabalho de Lin HL. et al⁷³, foi verificado que o 2-Metoxiestradiol (2-ME: metabolito activo da estrogénico purificado da urina) tinha efeito anti-angiogénico quer pela toxicidade directa nas células endoteliais, quer pela inibição do equilíbrio dinâmico da polimerização de microtúbulos pela paragem do ciclo celular na fase G₂/M, induzindo a apoptose. O 2-ME inicia a actividade da *caspase-8* que é seguida pela activação da *caspase-3* que conduz à fragmentação do DNA. A introdução deste novo factor anti-angiogénico de administração oral e sem efeitos adversos detectáveis, poderá vir a ser uma arma efectiva no arsenal terapêutico contra o cancro do estômago.

Alfa-difluorometilornitina (DMFO: usado em quimioterapia e quimioprevenção; tem uma acção anti-angiogénica e indutora da apoptose, tendo um importante papel na inibição do crescimento tumoral e formação de metástases no carcinoma gástrico)⁷⁴.

CARCINOMA DA MAMA

O valor prognóstico da angiogénese no cancro da mama foi estudado por Hansen et al num estudo que envolveu 836 pacientes portadoras de carcinoma da mama primário invasivo unilateral operado. O tempo médio de follow-up foi de 11 anos e 4 meses e a DMV foi avaliada pelo método da grelha de Chalkley. Os tumores foram marcados com anticorpos dirigidos contra as células endoteliais (anticorpos anti-CD4) e depois foi colhido um fragmento tumoral sobre o qual foi colocada uma grelha quadriculada (grelha de Chalkley) aquando da observação ao microscópio. As áreas onde as células endoteliais interceptam os espaços da grelha foram contados e a sua soma constitui o índice de Chalkley. O estudo revelou correlações estatisticamente significativas entre valores elevados do Chalkley e metástases ganglionares, tumores de grande tamanho, grau histológico de elevada malignidade (valores do índice de Chalkley mais elevados em carcinomas lobulares invasivos do que em carcinomas ductais invasivos) e mau prognóstico (em termos de sobrevida total e sobrevida sem doença). Por exemplo, pacientes com índice de Chalkley > 7 apresentam um risco relativo de morte de 1,46 quando comparadas com pacientes com um índice entre 5 e 7, enquanto esse risco é de 2.26 quando a comparação é feita com pacientes em que o índice é < 5 . Deste modo confirma-se que a angiogénese, avaliada pela determinação da DMV (pelo método da grelha de Chalkley), tem valor prognóstico no cancro da mama, o que pode ser particularmente útil para seleccionar entre as pacientes sem adenopatias as que têm maior risco e que poderão por isso beneficiar com a instituição de terapêutica adjuvante⁷⁵. Um estudo realizado por Heiman envolvendo 168 pacientes com cancro da mama e sem metástases ganglionares, obteve resultados que suportam a ideia de que a angiogénese constitui um parâmetro de prognóstico mais significativo do que o tamanho tumoral e o grau histológico⁷⁶.

Jitsuiki et al quiseram saber se a angiogénese apresentava diferentes intensidades nas diversas partes do tumor e quais as implicações que isso teria para a recidiva tumoral e para o grau histológico. Os microvasos foram marcados com CD31 e a DMV foi determinada em três zonas tumorais (central, intermédia e periférica) em 147 casos de carcinoma ductal invasivo. A média da DMV das zonas central, intermédia e periférica foi respectivamente de 34.4, 39.4, 51.5, o que corresponde a um aumento significativo da DMV do centro para a periferia. Verificou-se também que o valor da DMV de pelo menos uma zona tumoral tem correlação com o estágio da classificação TNM. Por outro lado existe correlação directa e estatisticamente significativa entre a fibrose tumoral e o valor de DMV em cada uma das áreas tumorais. Por último, constatou-se ainda com

significância estatística que os tumores com maiores níveis de DMV na zona periférica estavam associados a maiores índices de recidiva tumoral e, portanto, a pior prognóstico. Este estudo demonstrou que a angiogénese na zona tumoral periférica tem valor prognóstico e a fibrose tumoral, estando directamente relacionada com o nível de angiogénese, pode ser usada como um marcador do potencial maligno do cancro da mama⁷⁷.

Gasparini, num artigo de revisão sobre o significado da determinação dos marcadores da angiogénese, refere que os principais marcadores são: VEGF, TP e FGF. Dentro destes o VEGF é o que parece ter maior valor em termos de indicações prognósticas, fazendo o autor questão de sublinhar com particular ênfase, a possibilidade de os elevados níveis de VEGF poderem ser usados para diferenciar um subgrupo de doentes com carcinoma da mama portadoras de pior prognóstico e que beneficiarão pouco com a terapêutica adjuvante convencional e para as quais a descoberta de terapêuticas antiangiogénicas, por exemplo com elementos anti VEGF, constitui uma esperança legítima^{78,79}. Mais de 90% dos estudos realizados sobre o carcinoma da mama e envolvendo o VEGF concluíram que este factor esta relacionado com a sobrevida total e/ou com a sobrevida sem doença nessas doentes. Callagy e al determinaram que o nível de expressão tumoral de VEGF no carcinoma da mama, como indicador da angiogénese, constitui um parâmetro prognóstico mais seguro que a determinação dos níveis séricos de VEGF ou a determinação da DMV⁸⁰.

Linderholm et al desenvolveram um estudo com o objectivo de investigar a relação entre a mutação de p53 e a expressão de VEGF e avaliar o valor prognóstico desses dois factores. Este estudo incluiu 833 pacientes portadoras de cancro mamário invasivo, 485 sem metástases ganglionares (N_0) e 348 com metástases ganglionares, nas quais foram estimadas a sobrevida total (ST) e a sobrevida sem doença (SSD). O VEGF e o p53 foram determinados através de imunoanálise enzimática. Os resultados obtidos demonstraram com significância estatística uma associação entre a mutação de p53 e a expressão de VEGF e a existência de valor prognóstico independente de cada um dos factores em termos de ST e SSD (a presença de apenas um factor determina um aumento do risco relativo de 1,7 enquanto a presença de ambos os factores esta associada a um aumento do risco relativo de 2,7%). Assim, constituirão um grupo de alto risco (com pior prognóstico em termos de ST e SSD) as pacientes que apresentem simultaneamente a mutação de p53 e a expressão de VEGF⁸¹.

Recentemente foi descoberto um novo membro da família VEGF, o VEGF-B cujo receptor é flt-1. Gunningham et al realizaram um estudo que envolveu 68 cancros invasivos

da mama e 13 amostras de tecido mamário normal. A expressão de VEGF-B e do seu receptor flt-1 foram determinados por métodos imunohistoquímicos. A expressão de flt-1 apresentou níveis mais elevados nos tumores do que no tecido normal, mas não se verificaram diferenças significativas da expressão de VEGF-B entre o tecido normal e o tecido neoplásico. Verificou-se uma correlação directa e estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF-B e a existência de adenopatias bem como com o número da adenopatias. Não se verificou correlação significativa entre a expressão de VEGF-B nem de flt-1 com a vascularização e tamanho tumorais. Os resultados deste estudo sugerem, portanto, que VEGF-B contribui para a progressão tumoral mas por um mecanismo não angiogénico. A procura de agentes que bloqueiem flt-1 constitui uma nova esperança terapêutica⁸². Neste momento também já são conhecidos VEGF-C e VEGF-D, outros dois elementos da mesma família, que parecem estar envolvidos no desenvolvimento da vascularização tumoral linfática. Num estudo dirigido por Kurebayashi, constatou-se que o VEGF-A e o VEGF-B se encontram em todos os carcinomas da mama independentemente de terem ou não metástases, enquanto o VEGF-C e o VEGF-D se detectam apenas nos com metástases ganglionares. Estes resultados sugerem a existência duma relação entre o nível de expressão de VEGF C e VEGF D e o desenvolvimento de extensão tumoral linfática⁸³.

Yang et avaliaram a relação entre a timidina fosforilase -TP e outras variáveis clinicopatológicas. Usaram material de 116 carcinomas primários da mama fixados em formol e incluídos em parafina. Através de métodos imunohistoquímicos determinaram a expressão de TP, receptores estrogénicos, Bcl-2, Bax, p53, c-erb2 e MIB1. Demonstraram que a expressão de TP apresenta uma correlação significativa e inversa com o grau histológico e uma correlação também significativa mas directa com a expressão Bcl-2. Assim a TP pode ser um novo parâmetro prognóstico⁸⁴. Em 34 carcinomas in situ e 32 carcinomas invasivos Lee et al verificaram que a expressão de TP esta significativa e directamente correlacionada com a vascularização tumoral no caso dos carcinomas in situ mas não nos carcinomas invasivos⁸⁵.

O FGF localiza-se exclusivamente nas células do estroma (não se encontra nas células epiteliais); os níveis de FGF encontram-se significativamente mais elevados nos carcinomas da mama do que nos tecidos não tumorais das mamas correspondentes; existe uma correlação directa e significativa entre FGF e os receptores de estrogénios e uma correlação inversa e significativa entre os níveis de FGF e o tamanho e estágio tumorais; não existe correlação significativa dos níveis de FGF com a DMV nem com o

prognóstico em termos de sobrevida total e sobrevida sem doença. Assim, o FGF é um factor angiogénico e encontra-se significativamente mais elevado nos carcinomas da mama do que no tecido mamário normal, mas não constitui um factor de prognóstico independente⁸⁶.

Só em Março de 2000 foi publicado o primeiro estudo sobre as implicações clínicas que a angiogénese pode ter nas metástases. Guidi et al compararam a DMV nos carcinomas primários da mama com a DMV das metástases ganglionares de tumores da mama. Foi feita a marcação com o anticorpo anti-factor VIII em secções de 47 tumores primários da mama e de 91 metástases ganglionares, pertencentes a um total de 110 pacientes, portadoras de carcinoma da mama e com metástases ganglionares. Nas pacientes portadoras de carcinoma da mama com metástases a avaliação da neovascularização a nível das metástases constitui um parâmetro prognóstico importante e mais decisivo do que o nível da angiogénese no tumor primário, por estar relacionado com o tempo de sobrevida⁸⁷. Em 104 mulheres com cancro da mama T₁₋₂N₀M₀ tratadas com terapêutica loco-regional, pretendia-se saber que factores estariam relacionados com uma recaída precoce sob a forma de doença metastática quando este tipo de tumores são tratados duma forma conservadora. Concluiu-se que havia uma correlação estatisticamente significativa com a doença metastática precoce e o nível da angiogénese⁸⁸. Em 50 doentes com carcinoma da mama e 12 funcionando como controlos, a DMV foi determinada em cada um dos casos através de métodos imunohisto-químicos, usando como marcadores o anticorpo anti CD31 que se fixa tanto em neovasos como em vasos maturos e o anticorpo anti LH39 que reconhece um epitopo localizado na lamina lúcida de pequenas veias e capilares maturos e não em neovasos. Assim, os vasos maturos ficaram marcados com ambos os anticorpos enquanto os neovasos ficaram marcados apenas com o anticorpo anti CD31. Com os valores obtidos calculou-se para cada indivíduo o índice de maturação vascular (IMV), definido pela seguinte fracção: DMV dos vasos maturos/DMV da totalidade de vasos. A análise dos valores obtidos e a sua correlação com diversas variáveis clinicopatológicas conduziu aos seguintes resultados: IMV significativamente mais elevado nos controlos do que nas pacientes com cancro da mama; correlação inversa e estatisticamente significativa entre IMV e a presença de ganglios linfáticos metastizados; ausência de correlação significativa entre IMV e outras variáveis clinicopatológicas tais como tamanho tumoral, nível de angiogénese e estágio tumoral. Estas premissas são suficientes para legitimar a conclusão de que IMV poderá ser usado para identificar um subgrupo de pacientes portadoras de maior probabilidade de envolvimento dos ganglios

ganglionares⁸⁹.

No estudo de Li et al em 93 pacientes com carcinoma da mama precoce ainda sem qualquer tratamento e 77 controlos (mulheres sem cancro da mama) foram medidos os níveis séricos de CD105 (o receptor endotelial de VEGF) e de VEGF. Verificou-se correlação positiva e significativa entre os níveis de CD105 e o desenvolvimento posterior de metástases à distância, correlação essa mais significativa quando se investiga o VEGF. Estes dados indicam que os níveis séricos de CD105 constituem um marcador angiogénico para identificar entre as pacientes com cancro da mama, aquelas que têm maior risco de desenvolver metástases⁹⁰.

Knopp et al, usando a RMN com gadolínio realizaram uma análise correlativa da histologia, da densidade vascular (CD31) e da permeabilidade vascular (factor de permeabilidade vascular VPF/factor de crescimento vascular endotelial VEGF) e obtiveram com significância estatística os seguintes resultados: mais rápido aparecimento e mais rápido desaparecimento do realce em lesões malignas do que em lesões benignas; padrões de realce diferentes de acordo com o tipo histológico (carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo); e relação entre a expressão de VPF/VEGF e a cinética do realce. Este estudo é importante porque nos indica que a RMN com gadolínio não só permite diferenciar uma lesão maligna duma benigna como também é capaz de subclassificar os cancros da mama de acordo com as suas propriedades angiogénicas⁹¹.

Ainda neste âmbito, tanto Han et al como Yoon et al verificaram, através das suas investigações, a existência de correlação positiva e significativa entre o nível de angiogénese e a captação de Tc^{99m}-metoxiisobutilisonitrilo em estudos cintigráficos⁹²⁻⁹³.

Para estudar eventual correlação entre metastização ganglionar e angiogénese, Viens et al investigaram 135 casos de carcinoma da mama com metástases ganglionares linfáticas de doentes a receberem tratamento com antraciclina. Marcaram os microvasos com CD31 e os resultados revelaram com significância estatística que altos índices de angiogénese (revelados por elevada DMV) estavam associados com a diminuição da sobrevida. Em conclusão, este estudo indicou que a angiogénese é um factor de prognóstico independente nas pacientes com cancro da mama e com metástases ganglionares mesmo quando tratadas com quimioterapia adjuvante, pelo que as estratégias adjuvantes neste tipo de pacientes tenham que ser repensadas⁹⁴.

Gasparini et al determinaram o papel de VEGF e da TP e de alguns factores de prognóstico convencionais, na esti-

mativa da ST e da SSD, em dois grupos de pacientes com carcinoma da mama com metástases, um deles de 137 doentes tratados com ciclofosfamida, metotrexato e 5fluoracilo e outro com 164 pacientes que receberam hormonoterapia (tamoxifeno). O tempo médio de follow up foi de 72 meses para ambos os grupos. Os níveis de VEGF e TP foram determinados através de métodos imunométricos: elevados níveis de TP e baixos níveis de VEGF caracterizam os doentes que tratados com quimioterapia adjuvante têm maior probabilidade de obter bons resultados; baixos níveis de VEGF e poucos gânglios linfáticos envolvidos (<3) caracterizam os doentes que beneficiarão mais com a terapêutica hormonal adjuvante⁹⁵. A expressão de VEGF está geralmente associada a resistência à terapêutica endócrina enquanto uma forte expressão de TP diminuirá a sensibilidade a esquemas de quimioterapia que contenham o 5 Fluoracilo⁹⁶. Marson et al realizaram um estudo com o objectivo de conhecer qual o efeito do tamoxifeno na vascularização do cancro da mama. Houve resposta positiva em 53 pacientes; ausência de diferenças significativas na DMV pré-tratamento nos tumores com resposta positiva em comparação com os que tiveram resposta negativa; DMV pós-tratamento significativamente mais elevada nos tumores com resposta negativa relativamente aos que apresentaram resposta positiva; redução significativa da DMV com o tratamento nos tumores com resposta positiva enquanto nos tumores com resposta negativa se verificou um aumento significativo da DMV; correlação estatisticamente significativa entre o grau de resposta e a DMV. Este estudo data de Maio de 2001 e constitui a primeira demonstração objectiva da redução da angiogénese no cancro da mama em tumores com resposta positiva à terapêutica com tamoxifeno⁹⁷.

Kuroi et al realizaram um estudo com o objectivo de avaliar eventuais implicações dos níveis plasmáticos de endostatina (PEL), um regulador negativo da angiogénese. Em 147 pacientes sem metástases ganglionares, foram medidos os níveis de PEL através de métodos imunoenzimáticos e havia PEL mais elevados em pacientes pós-menopausicas do que pré-menopausicas; aumento do PEL após a terapêutica adjuvante com tamoxifeno; melhor prognóstico em termos de sobrevida sem doença nas pacientes com cancro da mama sem adenopatias que apresentam elevado PEL do que nas mulheres com o mesmo tipo de doença mas baixo PEL⁹⁸.

A prolactina estimula a proliferação das células tumorais do cancro da mama, o que incitou a utilização de agonistas da dopamina no tratamento desta patologia. Goffin et al descobriram que um fragmento da prolactina, o PRL 16K, inibe a angiogénese⁹⁹. Um estudo realizado por Greb et al permitiu verificar que a expressão de VEGF diminui

após a menopausa no tecido mamário normal mas não no cancro da mama. Assim, a regulação da vascularização no cancro da mama, ao contrário da mama normal, parece ser não hormonodependente. Isto justifica a actual falta de entusiasmo relativamente à procura de terapêuticas antiangiogénicas hormonais¹⁰⁰. Hyder et al demonstraram que as progestinas, tanto endógenas como exógenas, induzem a expressão de VEGF no cancro da mama e portanto estimulam o crescimento tumoral. Este estudo levanta assim a hipótese da utilização futura de terapêuticas anti-progestinas para diminuir a proliferação tumoral em alguns casos de cancro da mama primário e suas metástases¹⁰¹.

SARCOMAS

Os sarcomas humanos expressam diversos factores pró-angiogénicos que poderiam representar alvos para estratégias terapêuticas futuras. Como as células endoteliais são geneticamente estáveis e têm uma baixa taxa de mutações, é previsível que mantenham sensibilidade a uma terapêutica anti-angiogénica.

Embora a expressão de VEGF esteja directamente relacionada com o prognóstico de carcinomas, a relação entre a expressão de VEGF e o prognóstico de sarcomas é contraditória. Foi demonstrado que a maioria dos sarcomas de tecidos moles expressa VEGF em altos níveis, no entanto, segundo esse mesmo estudo, não foi possível classificar a expressão de VEGF como factor prognóstico independente¹⁰⁴. Os resultados de um outro estudo que incidiu sobre casos de sarcoma torácico sugerem que a expressão de VEGF é de facto um factor prognóstico independente em doentes com esta patologia¹⁰⁵.

Em sinoviossarcomas a angiogénese não desempenha um papel importante na metastização destes sarcomas e na sobrevivência global. Levantou-se a hipótese de que o controlo da angiogénese poderia ser protagonizado por outros factores para além do VEGF¹⁰⁶.

Um estudo efectuado em séries de mixofibrossarcoma e lipossarcoma mixoide e de células redondas, caracterizados por diferentes padrões vasculares, demonstrou a existência de correlação entre a progressão tumoral e o aumento da densidade microvascular intratumoral em mixofibrossarcomas mas não em lipossarcomas. Ambos os tumores expressam VEGF. No mixofibrossarcoma foi detectada uma intensa expressão de colagénio tipo I e trombospondina I não encontrada no lipossarcoma¹⁰⁷.

Neurofilinas são moléculas expressas por células não endoteliais, incluindo células tumorais, que constituem potentes receptores para o VEGF. O VEGF produzido pelas células tumorais poderia aderir à sua superfície e atrair células endoteliais ou mediar de modo parácrino a ade-

ção de células tumorais em redor dos vasos. A expressão de neurofilina-2 em osteossarcomas foi implicada na promoção da angiogénese e crescimento tumoral em tumores com expressão de VEGF e foi associada a um pior prognóstico¹⁰⁸. Em contrapartida num estudo retrospectivo em doentes com osteossarcoma não metastático, a neovascularização intratumoral determinada aquando do diagnóstico não demonstrou correlação com a evolução da doença a longo prazo¹⁰⁹.

A maioria dos doentes com sarcomas de tecidos moles, apresenta níveis séricos elevados de VEGF e bFGF no pré-operatório. Sugeriu-se que a consecutiva monitorização dos níveis séricos de VEGF e bFGF destes doentes poderia ser útil para follow-up¹¹⁰.

Estudos imunohistoquímicos demonstraram a ocorrência de receptores de hormona de crescimento (GH-R) em células de lipoma e de lipossarcoma. Imunoreactividade particularmente pronunciada foi detectada a nível dos capilares formados de novo. Estes resultados apontam para que o GH-R possa desempenhar um papel importante na angiogénese e no crescimento de lipossarcomas e abre mais uma possibilidade de intervenção com agentes anti-angiogénicos¹¹¹.

É actualmente reconhecido que uma terapia anti-retrovírica efectiva está associada à diminuição da incidência de KS associada à SIDA e regressão do tamanho das lesões já estabelecidas. O efeito benéfico da supressão da replicação do HIV possivelmente está relacionado com o facto de que substâncias elaboradas pelas células infectadas pelo HIV poderão promover angiogénese e crescimento do KS¹¹².

O VEGF tem sido implicado não apenas na angiogénese associada ao KS, como também no controlo do crescimento das células tumorais, migração e invasão. A terapêutica com agentes inibidores do VEGF possivelmente será efectiva na redução do crescimento tumoral e do edema associado ao KS. Os resultados de um ensaio clínico de fase I com SU5416 (inibidor de BPM de VEGF-Flk/KDR receptor tirosina cinase) mostraram na maioria dos doentes estabilização da doença ou mesmo diminuição das lesões, com bons níveis de tolerância¹¹³.

O bFGF está também envolvido no processo de proliferação e angiogénese observado no KS. Foi demonstrado que o bFGF actua sinergicamente com a Tat no efeito angiogénico, mediante indução da expressão da integrina $\alpha v \beta 3$ que se liga a Tat. A integrina $\alpha v \beta 3$ promove o crescimento, a migração e adesão das células endoteliais. Estes dados sugerem que os competidores da integrina $\alpha v \beta 3$ poderão ser considerados como uma estratégia de tratamento do KS associado à SIDA¹¹⁴. Um

estudo em que se determinaram os níveis séricos de FGF-2 em grupos de doentes com KS associado à SIDA sugeriu que o FGF 2 pode servir como marcador prognóstico e da eficácia da terapêutica anti-retrovírica¹¹⁵.

O K-FGF é produto de um oncogene expresso no KS associado à SIDA que partilha homologia parcial com os FGF ácido e básico e que tem actividade angiogénica relacionada. O K-FGF poderá contribuir para a proliferação tumoral por um mecanismo autócrino e estimular a proliferação do endotélio capilar por via parácrina¹¹⁶.

IM 862 é um peptídeo endógeno com propriedades antiangiogénicas. Um estudo randomizado com IM 862 intranasal em doentes com KS associado à SIDA, demonstrou actividade antitumoral e bons níveis de tolerância¹¹⁷.

Há diminuição dos níveis da TSP-1 a nível das lesões KS e a diminuição da transcrição da TSP relaciona-se com o desenvolvimento da angiogénese associada ao KS.

A talidomida tem sido testada em ensaios clínicos de fase II, no tratamento do KS, tendo apresentado benefício clínico com doses bem toleradas. Esta substância apresenta propriedades antiangiogénicas, no entanto o mecanismo subjacente não foi ainda elucidado.

CONCLUSÕES

A determinação imunohistoquímica do VEGF em todos os carcinomas parece estar definida para prever o prognóstico, independentemente do tipo histológico, uma vez que se associa ao desenvolvimento de metástases ganglionares.

No carcinoma colo-rectal e no carcinoma da mama é importante como marcador da recidiva tumoral. Este parâmetro tem valor reforçado quando associado a alterações do p53, nomeadamente o aumento da sua expressão no tecido neoplásico.

No carcinoma broncopulmonar de células não pequenas, a angiogénese é importante na avaliação de lesões pré-neoplásicas, nomeadamente na definição da displasia epidermóide angiogénica.

Para o carcinoma gástrico, a determinação de COX-2 em lesões pré-neoplásicas pode prever o seu desenvolvimento.

O estudo exaustivo da angiogénese carcinomatosa permite apurar o papel dos vários factores implicados, independentemente dos métodos usados na avaliação da neovascularização. Nos sarcomas, ainda não há determinação definitiva do valor destes estudos que serão importantes para conhecer os mecanismos de metastização por via sanguínea.

BIBLIOGRAFIA

- DEVITA V, HELLMAN S, ROSENBERG S: Cancer - Principles and Practice - cap 9. 5ª edição. Lippincott Williams & Wilkins. New York. 2001
- BRAUNWALD E, FAUCI A, KASPER D et al: Harrison's Principles of Internal Medicine - cap 83. 15ª edição. McGraw-Hill. New York. 2001
- COTRAN R, KUMAR V, COLLINS T: Robbins Pathologic Basis of Disease - cap 8. 6ª edição. WB Saunders. Philadelphia. 1999
- DOMINICI M, CAMPIONI D, LANZA F, et al: Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial colonies growth (CFU-En) and clinical-biological features. *Leukemia* 2001;15(1):171-176
- RAJKUMAR SV, FONSECA R, WITZIG TE, GERTZ MA, GREIPP PR: Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13(3):469-472
- VACCA A, RIBATTI D, RUCO L, et al: Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's Lymphomas. *British Journal of Cancer* 1999;79(5-6):965-970
- AUDERO E, CASCONI I, ZANON I: Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: in vivo and in vitro studies. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 2001;21(4):536-541
- AHMAD SA, LIU W, JUNG YD, et al: Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis. *Cancer*, 2001;92(5):1138-1143
- NEEMAN M, PROVENZALE JM, DEWHIRST MW: Magnetic resonance imaging applications in the evaluation of tumor angiogenesis. *Seminars in Radiation Oncology*, 2001;11(1):70-82
- IMADA A, SHIJUBO N, KOJIMA H, ABE S: Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *European Respiratory Journal*, 2000;15(6):1087-1093
- TAKANAMI I, TAKEUCHI K, NARUKE M: Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88(12):2686-2692
- EEROLA AK, SOINI Y, PAAKKO P: Tumour infiltrating lymphocytes in relation to tumour angiogenesis, apoptosis and prognosis in patients with large cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 1999; 26(2): 73-83
- NISHIE A, ONO M, SHONO T, et al: Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clinical Cancer Research* 1999;5(5):1107-1113
- RIEDEL F, GOTTE K, SCHWALB J, SCHAFFER C, HORMANN K: Vascular endothelial growth factor expression correlates with p53 mutation and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Oto-Laryngologica* 2000;120(1):105-111
- SANZ-ORTEGA J, STEINBERG SM, MORO E: Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFR as prognostic factors in gastric cancer. *Histology & Histopathology* 2000;15(2):455-62
- KONDO Y, ARII S, FURUTANI M, et al: Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88(8):1820-1827
- CHIBA Y, TANIGUCHI T, MATSUYAMA K, et al: Tumor angiogenesis, apoptosis, and p53 oncogene in stage I lung adenocarcinoma. *Surgery Today* 1999;29(11):1148-53
- GIATROMANOLAKI A, STATHOPOULOS GP, TSIOBANOU E, et al: Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in

- the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999;86(8):1421-1430
19. ALVAREZ AA, AXELROD JR, WHITAKER RS, et al: Thrombospondin-1 expression in epithelial ovarian carcinoma: association with p53 status, tumor angiogenesis, and survival in platinum-treated patients. *Gynecologic Oncology* 2001;82(2):273-278
 20. OZER E, OZKAL S, KARADEMIR S, et al: Angiogenesis and p53 and H-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Analytical & Quantitative Cytology & Histology* 1999;21(6):473-476
 21. OH-E H, TANAKA S, KITADAI Y, SHIMAMOTO F, YOSHIHARA M, HARUMA K: Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Diseases of the Colon & Rectum* 2001;44(8):1129-1136
 22. TIEN YW, CHANG KJ, JENG YM, et al: Tumor angiogenesis and its possible role in intravasation of colorectal epithelial cells. *Clinical Cancer Research* 2001;7(6):1627-1632
 23. ZHANG X, KONG C, TAKENAKA I: Evaluation of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Urology* 2001;57(5):981-985
 24. BRAYBROOKE JP, O'BYRNE KJ, PROPPER DJ, et al: A phase II study of razoxane, an antiangiogenic topoisomerase II inhibitor, in renal cell cancer with assessment of potential surrogate markers of angiogenesis. *Clinical Cancer Research* 2000;6(12):4697-4704
 25. ERENOGLU C, AKIN ML, ULUUTKU H, TEZCAN L, YILDIRIM S, BATKIN A: Angiogenesis predicts poor prognosis in gastric carcinoma. *Digestive Surgery* 2000;17(6):581-586
 26. MACLEAN AB, REID WM, ROLFE KJ, et al: Role of angiogenesis in benign, premalignant and malignant vulvar lesions. *Journal of Reproductive Medicine* 2000;45(8):609-612
 27. KUROI K, TOI M: Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *International Journal of Biological Markers* 2001; 16(1): 5-26
 28. YUAN A, YANG PC, YU CJ, et al: Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 2000;162(5):1957-1963
 29. VALTOLA R, SALVEN P, HEIKKILA P, et al: VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *American Journal of Pathology* 1999;154(5):1381-1390
 30. VORAVUD N, CHARURUK N: Tumor angiogenesis. *Journal of the Medical Association of Thailand* 1999;82(4):394-404
 31. MARIA WONG, NGAI CHEUNG, SIU T YUEN, SUET Y LEUNG AND L PING CHUNGET: Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *International Journal of Cancer* 1999;81:845-850
 32. WERTHER K, CHRISTENSEN IJ, BRUNNER N, NIELSEN HJ, DANISH R: Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. The Danish RANX05 Colorectal Study Group. *European Journal of Surgical Oncology* 2000;26(7):57-662
 33. THIERRY ANDRÉ, LARISSA KOTELEVETS, JEAN CRISTOPHE VAILLANT, et al: VEGF, VEGF-B, VEGF-C, and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. *International Journal of Cancer* 2000;86:174-181
 34. TOKUNAGA T, OSHIGA Y, ABE Y, OZEKI Y: Vascular endothelial growth factor (VEGF)mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *British Journal of Cancer* 1998;77(6):998-1002
 35. SHAHEEN RM, TSENG WW, VELLAGAS R, et al: Effects of an antibody to vascular endothelial growth factor receptor-2 on survival, tumor vascularity, and apoptosis in a murine model of colon carcinomatosis. *International Journal of Oncology* 2001;18(2):221-226
 36. YUTAGA TAKAHASHI, CORAZON D. BUCANA, KAREN R.CLEARY, LEE M. ELLIS: p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *International Journal of Cancer* 1998;79:34-38
 37. AHMAD SA, LIU W, JUNG Y.D, FAN F, REINMUTH N, BUCANA CD, ELLIS LM: Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis. *Cancer* 2001;92:1138-1143
 38. MAEDA K, NISHIGUCHI Y, KANG S, et al: Expression of thrombospondin-1 inversely correlated with tumor vascularity and hematogenous metastasis in colon cancer. *Oncology Reports* 2001;8(4):763-766
 39. TOKUNAGA T, OSHIGA Y, NAKAMURA M, et al: Thrombospondin-2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *British Journal of Cancer* 1999;79(2):354-359
 40. KAWAKAMI T, TOKUNAGA T, HATANAKA H, et al: Interleukin 10 expression is correlated with thrombospondin expression and decreased vascular involvement in colon cancer. *International Journal of Oncology* 2001;18(3):487-491
 41. MICHAEL BOUVET, LEE M, NISHIZAKI M, et al.: Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Research* 1998;58:2288-2292
 42. HIROKI K, WATARU Y, HISASHI SHINOHARA, et al: Induction of angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *American Journal of Pathology* 2000; 157(5): 1523-1535
 43. SHAHEEM R, AHMAD S, LIU W, et al: Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *British Journal of Cancer* 2001;85(4):584-589
 44. SCHWARTZ, et al: Princípios de Cirurgia, compêndio- cap.16. MC Graw Hill.Rio de Janeiro. 2000
 45. MARIA TERESA MAGALHÃES GODINHO; C.Alves Pereira-Cirurgia, Patologia e Clínica-cap.17.MC Graw Hill.Lisboa.1999
 46. ADI F. GAZDAR, JOHN D. MINNA: Angiogenesis and the Multistage Development of Lung Cancers. *Clinical Cancer Research* 2000;6:1611-1612
 47. KEITH et al: Angiogenic Squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2000;6: 1616-1625
 48. G. COX, J.L. JONES, R.A. WALKER, W.P. STEWARD, K.J. O'Byrne. Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000;27:81-100
 49. T. YANO, S. TANIKAWA, T.FUJIE, M. MASUTANI, T. HORIE: Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer* 2000;36:601-609
 50. YAMASHITA J, OGAWA M, ABE M, NISHIDA M: Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase concentrations differ in small cell and non-small cell lung cancer. *Chest* 1999;116(1):206-211
 51. YUAN A, YANG P C, YU C J, et al: IL-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in NSCLC. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*.2000;162(5):1957-1963
 52. WONG M P, CHAN SY, FU KH, et al: The Angiopoietins, tie 2 and Vascular endothelial growth factor are differentially expressed in the transformation of normal lung to non-small cell lung carcinomas. *Lung*

Cancer.2000;29(1):11-22

53. BOLDRINI L, CALCINAI A, SAMARITANI E, et al: Tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor- beta are significantly associated with better prognosis in Non-Small Cell lung carcinoma: putative relation with bcl-2-mediated neovascularization. *British Journal of Cancer*.2000;83(4):480-486
54. BIRGITTE V. OFFERSEN, PER PFEIFFER, STEPHEN HAMILTON-DUTOIT, JENS OVERGAARD: Patterns of Angiogenesis in Nonsmall-Cell Lung Carcinoma. *American Cancer Society* 2001;91:1500-1509
55. PHILLIPS P G, BIRNBY LM, NARENDRAN A, MILONOVICH WL: Nitric Oxide modulates capillary formation at the endothelial cell-tumour cell interface. *American Journal of Physiology - Lung celular & molecular*.2001;281(1):278-290
56. GABRIELLA FONTANINI, LAURA BOLDRINI, ALESSANDRA CALCINAI, et al:Thrombospondins I and II Messenger RNA Expression in Lung Carcinoma: Relationship with p53 Alterations, Angiogenic Growth Factors, and Vascular Density. *Clinical Cancer Research*.1999;5:155-161
57. VOLM M, MATTERN J, KOOMAGI R: Relationship of urokinase and urokinase receptor in non-small cell lung cancer to proliferation, angiogenesis and patient survival. *Oncology Reports* 1999;6(3):611-615
58. UEFUJI K, ICHIKURA T, MOCHIZUKI H: Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clinical Cancer Research* 2000;6(1):135-138
59. TSUJI S, TSUJII M, KAWANO S, HORI M: Cyclooxygenase-2 upregulation as a perigenetic change in carcinogenesis. *Journal of Experimental & clinical Cancer Research* 2001;20(1):117-129
60. KONTUREK PC, HARTWICH A, ZUCHOWICZ M, et al: Helicobacter pylori, gastrin and cyclooxygenases in gastric cancer. *Journal of Physiology & Pharmacology* 2000;51(4Pt1): 737-749
61. OGAWA K, KONNO S, TAKEBAYASHI Y, et al: Effect of intratumoral OK-432 administration of thymidine phosphorylase expression in human gastric carcinoma. *Anticancer Research* 2001; 21(2B): 1257-1262
62. GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS MI, STATHOPOULOS GP, et al: Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorilase, and p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncology Research* 2000; 12(1): 33-41
63. KIKUYAMA S, INADA T, SHIMIZU K, MIYAKITA M: Thymidine phosphorilase expression in gastric cancer in association with proliferative activity and angiogenesis. *Anticancer Research* 2000;20(3B):2081-2086
64. ETOH T, INOUE H, TANAKA S, BARNARD GF, KITANO S, MORI M: Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Research* 2001;61(5):2145-2153
65. KIMURA H, KONISHI K, NUKUI T, et al: Prognostic significance of expression of thymidine phosphorilase and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *Journal of Surgical Oncology - Supplement* 2001; 76(1): 31-36
66. KITADAI Y, TAKAHASHI Y, HARUMA K, et al: Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *British Journal of Cancer* 1999;81(4):647-653
67. TAHARA E: Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie* 2000;84:43-49
68. KOIDE N, NISHIO A, IGARASHI J, KAJIKAWA S, ADACHI W, AMANO J: Alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: histochemical analysis of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94(6): 1658-1663
69. LEE JH, KOH JT, SHIN BA, et al: Comparative study of angstatic and anti-invasive gene expression as prognostic factors in gastric cancer. *International Journal of Oncology* 2001; 18(2): 355-361
70. KIM YB, HAN JY, KIM TS, KIM PS, CHU YC: Overexpression of c-H-ras p21 is correlated with vascular engothelial growth factor and neovascularization in advanced gastric carcinoma. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2000;15(12):1393-1399
71. TSUTSUMI S, KUWANO H, ASAO T, NAGASHIMA K, SHIMURA T, MOCHIKI E: Expression of Ets-1 angiogenesis-related protein in gastric cancer. *Cancer Letters* 2000; 160(1): 45-50
72. SHIN EY, LEE BH, YANG JH, et al: Up-regulation and co-expression of fibroblast growth factor receptors in human gastric cancer. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* 2000; 126(9): 519-528
73. LIN HL, LIU TY, WU CW, CHI CW: 2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells. *Cancer* 2001; 92(3): 500-509
74. TAKAHASHI Y, MAI M, NISHIOKA K: alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *International journal of Cancer* 2000; 85(2): 243-247
75. HANSEN S, GRABAU DA, SORENSEN FB, BAK M, VACH W, ROSE C: The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in confirmatory study desing on 836 breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2000;6(1):139-146
76. HEIMANN R, LAN F, MCBRIDE R, HELLMAN S: Separating favourable from unfavoreble prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Research* 2000;60(2):298-304
77. JITSUIKI Y, HASEBE T, TSUDA H, et al: Optimizing microvessel counts according to tumor zone in invasive ductal carcinoma of the breast. *Modern Pathology* 1999;12(5):492-498
78. GASPARINI G: Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 2001;37(2):97-114
79. GASPARINI G: Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000;5 Suppl 1:37-44
80. CALLAGY G, DIMITRIADIS E, HARMEY J, BOUCHIER-HAYES D, LEADER M, KAY E: Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2000;8(2):104-109
81. LINDERHOLM B, LINDH B, TAVELIN B, GRANKVIST K, HENRIKSSON R: p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *International Journal of Cancer* 2000; 89(1): 51-62
82. GUNNINGHAM SP, CURRIE MJ, HAN C, et al: VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *Journal of Pathology* 2001; 193(3): 325-332
83. KUREBAYASHI J, OTSUKI T, KUNISUE H, et al: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* 1999; 90(9): 977-981
84. YANG Q, SAKURAI T, YOSHIMURA G, et al: Thymidine phosphorylase expression correlates with tumor differentiation and Bcl-2 in invasive breast cancer. *Breast Cancer* 2000; 7(3): 210-214

85. LEE AH, DUBLIN EA, BOBROW LG: Angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase by inflammatory and carcinoma cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *Journal of Pathology* 1999; 187(3): 285-290
86. SMITH K, FOX SB, WHITEHOUSE R, et al: Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Annals of Oncology* 1999; 10(6): 707-713
87. GUIDI AJ, BERRY DA, BROADWATER G, et al: Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(6): 486-492
88. COLPAERT C, VERMEULEN P, JEURIS W, et al: Early distant relapse in "node-negative" breast cancer patients is not predicted by occult axillary lymph node metastases, but by the features of the primary tumour. *Journal of Pathology* 2001; 193(4): 442-449
89. KAKOLYRIS S, FOX SB, KOUKOURAKIS M, et al: Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *British Journal of Cancer* 2000; 82(4): 844-851
90. LI C, GUO B, WILSON PB, et al: Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *International Journal of Cancer* 2000; 89(2): 122-126
91. KNOPP MV, WEISS E., SINN HP, et al: Pathophysiologic basis of contrast enhancement in breast tumors. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 1999;10(3):260-266
92. HAN S, KIM JS, KIM BS, KOH IH, PARK K: 99mTc-MIBI scan in mammary Pagets disease: a case report. *Journal of Korean Medical Science* 1999;14(6):675-678
93. YOON JH, BOM HS, SONG HC, LEE JH, JAEGAL YJ: Double-phase Tc-99m sestamibi scintimammography to assess angiogenesis and P-glycoprotein expression in patients with untreated breast cancer. *Clinical Nuclear Medicine* 1999;24(5):314-318
94. VIENS P, JACQUEMIER J, BARDOU PJ, et al: Association of angiogenesis and poor prognosis in node-positive patients receiving anthracycline-based adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research & Treatment* 1999;54(3):205-212
95. GASPARINI G, TOI M, MICELI R, et al: Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer Journal From Scientific American* 1999;5(2):101-111
96. TOI M, BANDO H, KUROI K: The predictive value of angiogenesis for adjuvant therapy in breast cancer. *Breast Cancer* 2000;7(4):311-314
97. MARSON LP, KURIAN KM, MILLER WR, DIXON JM: The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. *Breast Cancer Research & Treatment* 2001;66(1):9-15
98. KUROI K, TANAKA C, TOI M: Circulating levels of endostatin in cancer patients. *Oncology Reports* 2001;8(2):405-409
99. GOFFIN V, TOURAINE P, PICHARD C, BERNICHTEN S, KELLY PA: Should prolactin reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer?. *Molecular & Cellular Endocrinology* 1999; 151(1-2): 79-87
100. GREB RR, MAIER, WALLWIENER D, KIESEL L: Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions. *British Journal of Cancer* 1999;81(2):255-231
101. HYDER SM, CHIAPPETTA C, STANCEL GM: Pharmacological and endogenous progestins induce vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells. *International Journal of Cancer* 2001;92(4):469-473
102. CHAO C, AL.SALEEM T, BROOKS JJ, ROGATKO A, KRAYBILL WG, EISENBERG B: Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: Tumor expression correlates with grade. *Annals of Surgical Oncology*. 2001; 8(3): 260-267
103. IYODA A, HIROSHIMA K, BABA M, FUJISAWA T, YUSA T, OHWADA H: Expression of vascular endothelial growth factor in thoracic sarcomas. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001; 71 (5): 1635-1639
104. KAWAUCHI S, FUKUDA T, TSUNEYOSHI M: Angiogenesis does not correlate with prognosis of expression of vascular endothelial growth factor in synovial sarcomas. *Oncol Rep* 1999; 6(5): 959-964
105. MENTZEL T, BROWN LF, DVORAK HF, et al: The association between tumos progression and vascularity in myxofibrosarcoma and myxoid/round cell liposarcoma. *Virchows Archiv*. 2001; 438 (1): 13-22
106. HANDA A, TOKUNAGA T, TSUCHIDA T, LEE YH, KIJIMA H, YAMAZAKI H, UEYAMA Y, FUKUDA H. NAKAMURA M: Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *International Journal of Oncology*. 2000; 17 (2): 291-295
107. MANTADAKIS E, KIM G, REISCH J et al: Lack of prognostic significance of intratumoral angiogenesis in nonmetastatic osteosarcoma. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*. 2001; 23 (5): 286-289
108. GRAEVEN U, ANDRE N, ACHILLES E, ZORNIG C, SCHMIEGEL W: Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft tissue sarcoma. *Jornal of Cancer Research & Clinical Oncology*. 1999; 125 (10): 577-581
109. TEMMIN L, KOLLE S, BAKER H, SINOWATZ F: Expression of growth hormone receptor in human liposarcomas and lipomas. *Oncology Reports*. 2000; 7 (4): 757-760
110. LEVINE AM, TULPUL A: Clinical aspects and management of AIDS related Kaposi's sarcoma. *European Journal of Cancer*. 2001; 37 (10): 1288-1295
111. ARASTEH K, HANNAH A: The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Oncologist*. 2000; 5 Suppl 1:28-31
112. BARILLARI G, SGADARI C, PALLADINO C, et al.: Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angionesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin. *Journal of Immunology*.1999; 136 (4): 1929-1935
113. ASCHERL G, SGADARI C, BUGARINI R, BOGNER J, SCHATZ O, ENSOLI B, STURZL M: Serum concentrations of fibroblast growth factor 2 are increased in HIV type 1-infected patients and inversely related to survival probability. *AIDS Research & Human Retroviruses*. 2001; 17(11): 1035-1039
114. KARP JUDITH E, GOOPMAN JEROME E, BRODER SAMUEL: *Cancer: Principles and Practise of Oncology*, 4th Ed., edited by De Vita Vincent T Jr. Hellman Samuel, Rosenberg Steven A. Lippincott J.B., Philadelphia 1993. Chapter 59, Cancer in AIDS, pg. 2094-2096
115. TULPUL A, SCADDEN DT, ESPINA BM, CABRIALES S, HOWARD W, SHEA K, GILL PS: Results of a randomizes study of IM862 nasal solution in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18 (4): 716-723
116. TARABOLETTI G, BENLLI R, BORSOTTI P, RUSNATI M, et al: Thrombosondin-1 inhibits Kaposi's sarcoma (KS) cell and HIV-1 Tat-induced angiogenesis and is poorly expressed in KS lesions. *Journal of Pathology*. 1999;188 (1). 76-81
117. LITTLE RF, WYVILL KM, PLUDA JM et al.: Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Journal of Clinic Oncology*. 2000;18 (13): 2593-2602