

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA DENSIDADE
VASCULAR INTRATUMORAL COM CD105 EM ESPÉCIMES
CIRÚRGICOS DE VESÍCULA BILIAR**

Andréa Oxley da Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2006.

Rocha, Andréa Oxley da

Avaliação imuno-histoquímica da densidade vascular intratumoral com CD105 em espécimes cirúrgicos de vesícula biliar / Andréa Oxley da Rocha ; orient. Lígia Maria Barbosa Coutinho – 2006.

111 f. il.color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Neoplasias da vesícula biliar 2. Carcinoma 3. Vesícula biliar : Patologia 4. CD105 5. Endoglin I. Coutinho, Lígia Maria Barbosa. II. Título.

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Para minha filha,
querida, Marília, a
quem dedico todo
meu esforço.

Agradecimentos

À minha orientadora, profa. Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho, que mais do que uma grande professora e pesquisadora, é uma grande e forte mulher, amiga, que acreditou nos meus projetos, e sempre me incentivou, em todos os momentos.

Ao departamento de Pós-graduação em Patologia da FFFCMPA, onde todo o meu trabalho foi desenvolvido, com o apoio incansável das funcionárias Rosalva e Terezinha.

Ao departamento de Patologias da FFFCMPA, que possibilitou a nossa pesquisa através da utilização dos seus arquivos.

Aos meus colegas de trabalho, em especial, Luís Foergens, Marcos Tang e Hilel Levin, sempre compreensivos e amigos.

Aos meus pais e meus irmãos que sempre me incentivaram a seguir adiante, ultrapassando as dificuldades.

À minha colega e grande amiga Laís Leboutte, sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	05
2- REVISÃO DA LITERATURA	09
2.1- Carcinoma de vesícula biliar.....	09
2.1.1- Fatores prognósticos e estadiamento.....	11
2.1.1.1. Classificação histológica.....	11
2.1.1.2. Grau histológico.....	11
2.1.1.3. Invasão vascular.....	12
2.1.1.4. Estadiamento TNM.....	13
2.2- Angiogênese	15
2.2.1. Métodos de avaliação da angiogênese.....	18
2.2.1.1. Anticorpo primário.....	19
2.2.1.2. Área e magnificação.....	20
2.2.1.3. Método de contagem.....	21
2.2.1.4. Experiência do observador.....	21
2.2.1.5. Ponto de corte para análise estatística.....	22
2.3- CD105	23
2.4- Índice de Chalkley.....	25
2.5. Angiogênese e carcinoma de vesícula biliar	29
3. OBJETIVOS	32
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5- ARTIGO 1- inglês	39
6- ARTIGO 2- inglês	58
7- ARTIGO 1- português	75
8- ARTIGO 2 –português	94

1. INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna de vesícula biliar é uma doença pouco freqüente, porém bastante letal. É o tumor maligno mais freqüente do trato biliar, ocupando o sexto lugar entre os tumores do trato digestivo^{31,61}, e apesar da baixa freqüência, é diagnosticado de forma incidental em aproximadamente 1 a 3% das peças de colecistectomias realizadas por colecistite³.

Uma vez que esta neoplasia apresenta quadro clínico inespecífico e os exames de imagem raramente fazem o diagnóstico em fases precoces da doença, este tumor está associado a um diagnóstico tardio e, raramente, antes da intervenção cirúrgica. Em vista destes fatos, o prognóstico desta patologia é ruim, e na maioria das séries, apresenta índice de sobrevida em 5 anos em torno de 5%, já que menos de 10% dos pacientes apresentam tumor ressecável no momento do diagnóstico. Desta forma, a média de sobrevida para pacientes portadores desta afecção é menor que 6 meses^{3,11,31,60}.

A incidência do carcinoma de vesícula biliar varia amplamente nas diferentes partes do mundo (figura 1), sendo mais freqüente em alguns países da América Latina e Índia. No Chile esta afecção encontra-se em terceiro lugar como causa de óbito quando comparada a todas as neoplasias, sendo a segunda entre os tumores do trato digestivo. Neste país, é a causa mais freqüente de morte por doença maligna entre as mulheres, com elevada incidência, em torno de 13 casos por 100.000 habitantes⁶⁸. Na Índia incide em cerca de 4,5 por 100 000 habitantes na população masculina, atingindo níveis de 10,1 por 100 000 habitantes em mulheres do norte deste país. Altas incidências também são relatadas em Israel, Polônia, México e Bolívia^{40,43,61,71}.

No Brasil, a incidência do carcinoma primário da vesícula biliar é de 0,8% em relação às demais neoplasias. Em Porto Alegre é responsável por 3,09 óbitos por 100.000 habitantes^{2,8}.

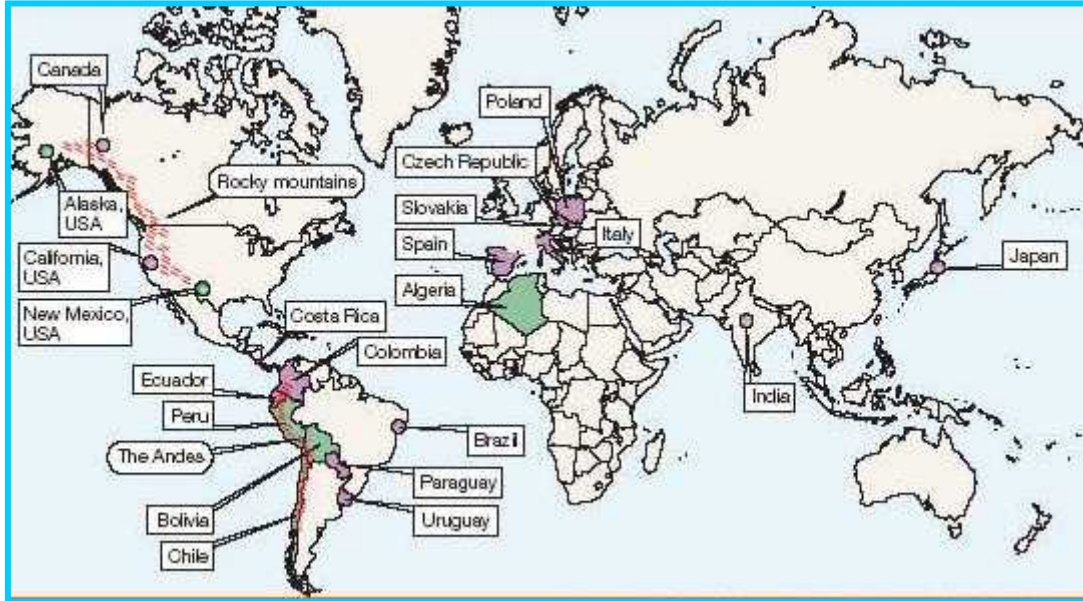


Figura 1. Incidência do carcinoma de vesícula no mundo mulheres

Áreas em verde são países com elevada incidência: acima de 9 mulheres/100.000 habitantes. Áreas em lilás apresentam moderada a alta incidência: 4-9mulheres/100.000 habitantes.

Nat Rev Cancer 2004

Este padrão têm se modificado nas últimas décadas, universalmente, com a demonstração de taxas de mortalidade por carcinoma de vesícula, inversamente proporcionais às taxas de colecistectomia^{43,71}.

Sendo a neoplasia de vesícula biliar uma doença de mau prognóstico decorrente, principalmente, do diagnóstico tardio, estudos desta afecção direcionam-se para a identificação de fatores de risco ou, no outro extremo, à busca de terapias que possam ser usadas em fases avançadas da doença, já que esta é pouco responsiva aos esquemas de radio ou quimioterapia disponíveis. Em vista deste fato, a terapia antiangiogênica representa uma das mais promissoras modalidades para o tratamento desta e outras neoplasias⁶, tornando o estudo da angiogênese um campo amplo para pesquisas na atualidade. Assim, o objetivo desta nova modalidade terapêutica é induzir a regressão tumoral e impedir sua disseminação metastática por bloqueio do fornecimento de nutrientes e oxigênio às células neoplásicas¹⁹, já que a angiogênese é a força propulsora necessária não só para o

crescimento tumoral, como também para a progressão de lesões pré-malignas para o câncer, na disseminação de células tumorais para a circulação sangüínea e na evolução de micrometástases dormentes em lesões francamente metastáticas⁵⁰.

Além deste enfoque terapêutico, a avaliação da angiogênese, através da medida da densidade vascular intratumoral, têm sido identificada como fator prognóstico para algumas neoplasias malignas, sendo que índices elevados de densidade vascular intratumoral, estão associadas, geralmente, a piores prognósticos^{15,20,25,29,67}.

O CD105 (endoglin) é uma glicoproteína expressa, predominantemente, na superfície das células endoteliais de vasos sangüíneos neoformados peri e intratumorais, que funciona como componente do receptor do Fator de Crescimento Transformante (TGF- β). Esta glicoproteína está envolvida no desenvolvimento e remodelamento vascular. Estudos imunohistoquímicos recentes, têm demonstrado que o CD105 está presente no endotélio ativamente proliferativo dos vasos sangüíneos de tecidos tumorais e desempenha papel importante na neoformação vascular. Além disso, vasos tumorais pequenos e, provavelmente, imaturos (que apresentam alto índice de proliferação) são, principalmente, corados por anticorpos monoclonais anti-CD105, como demonstrado em tumores de próstata⁶⁷ e mama¹⁹.

A avaliação da densidade de microvasos intratumoral, determinada usando anticorpos anti-CD105 tem demonstrado ser um indicador prognóstico independente para algumas neoplasias malignas, como no carcinoma de mama²⁹. Estas propriedades têm feito do CD105 um importante alvo para pesquisas de terapias antiangiogênicas^{15,20}.

Estudos de avaliação da angiogênese têm sido baseados, principalmente, na avaliação de campos de alta densidade vascular ("hot-spot"). Nestes campos são realizadas as contagens de microvasos corados imunohistoquimicamente, sob microscopia. Entretanto, diferentes estudos têm utilizado diferentes técnicas para realizar esta contagem^{6,21}, observando-se resultados conflitantes não só em relação a intensidade da densidade vascular, como também no que se refere à associação desta densidade com fatores prognósticos.

O método de Chalkley⁹ é uma das técnicas utilizadas para a contagem destes vasos neo-formados, sendo recomendada como padrão pelo "Second International Consensus on

the Methodology and Criteria of Evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors”⁶⁴, realizado em 2002, e aceito como um procedimento simples e rápido, para uso na prática clínica²⁹.

Sendo a angiogênese a força propulsora para o crescimento tumoral e, estando diretamente associada ao surgimento de metástases, as propriedades do CD105 tem feito dele um importante alvo para pesquisas de tumor por imagem, prognóstico e terapia antiangiogênica¹⁵. Além disso, desde Weidner et al.⁶⁶, que em 1991 publicaram o primeiro estudo mostrando a influência da neovascularização tumoral no prognóstico dos pacientes portadores de neoplasia maligna de mama, o avanço das pesquisas com marcadores de vasos intratumorais neoformados, identificaram, recentemente o CD105 como um fator prognóstico independente para esta neoplasia²⁰.

Semelhante ao que ocorre nas demais neoplasias, é de se supor que, um processo angiogênico similar seja necessário para o crescimento, invasão e metastatização do carcinoma de vesícula biliar. Entretanto, poucos estudos^{25,26,41,48,52,57}, com pequenas amostras e diferentes métodos de avaliação da angiogênese foram realizados, não havendo, ainda, um entendimento claro sobre a importância da neovascularização no carcinoma de vesícula biliar.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Carcinoma de vesícula biliar

O carcinoma de vesícula biliar acomete, principalmente, mulheres idosas, aumentando sua incidência com a idade: acima de 90% dos pacientes apresentam idade superior a 50 anos ao diagnóstico, sendo mais freqüente entre os 70 e 75 anos. Jukemura³⁸, em estudo recente realizado na Universidade de São Paulo, observou um aumento significativo na incidência do carcinoma de vesícula, proporcionalmente à idade, atingindo valores de 5,7% nos pacientes com mais de 60 anos.

A predominância do sexo feminino em relação ao masculino está demonstrada na literatura^{3,11,31,56}, porém com proporções que variam de 3:1 a 7:1, representando 8,1% dos tumores malignos nas mulheres.

Além das dificuldades de reconhecimento dos fatores envolvidos na gênese do carcinoma de vesícula biliar, o próprio quadro clínico inespecífico dificulta o diagnóstico precoce desta afecção^{10,31,38}. Assim, apesar do carcinoma de vesícula biliar ser a mais comum das doenças malignas do trato biliar, é sempre diagnosticada em estágios avançados, na maioria das vezes, já com invasão a órgãos adjacentes^{40,49}.

Antes da ultra-sonografia e da tomografia computadorizada de abdome, a taxa de diagnóstico pré-operatório era de somente 8,6%. A partir de 1980, com o desenvolvimento da tomografia computadorizada de abdome e da melhor resolução da ultra-sonografia, houve um incremento na acurácia e na sensibilidade da detecção desta neoplasia, resultando em um incremento no diagnóstico pré-operatório para 50 a 80% dos casos⁴⁰. Porém, mesmo com a utilização da tomografia, a detecção ocorre tardiamente, devido a inespecificidade do quadro clínico.

Esta neoplasia é, reconhecidamente, pouco responsiva aos diferentes tratamentos quimioterápicos, entretanto, há relatos de alguma eficácia da quimioterapia com mitomicina C e 5-fluoracil no tratamento das metástases linfonodais^{30,49}. Embora existam alguns relatos de

resposta positiva à radioterapia, este tumor continua sendo considerado, pela maioria dos estudos, como radiorresistente^{10,40}.

Os resultados do tratamento cirúrgico desta afecção, têm sido variáveis nos diferentes continentes^{25,38,45,55,65}. A maioria dos relatos da literatura, em termos de sobrevida em cinco anos do tratamento cirúrgico do carcinoma avançado de vesícula biliar, varia entre zero e 20%, sendo raros relatos, no mundo ocidental, de sobrevivência igual ou maior que 50%. No entanto, resultados para cirurgia radical no oriente, em termos de sobrevida, são muito melhores^{51,55}. Entretanto, apesar de todos os esforços, somente 15 a 25% dos adenocarcinomas avançados, são ressecados com margem cirúrgica livre de neoplasia^{10,40}, os demais pacientes devem ser tratados paliativamente para controle dos sintomas decorrentes da progressão da doença.

2.1.1 – Fatores prognósticos e estadiamento

Estudos realizados por Henson et al.³¹ em 1992 validaram fatores prognósticos para o carcinoma de vesícula biliar, que incluem o **tipo histológico** (tabela 1), o **grau histológico** da lesão (tabela 2), a **invasão vascular** e o **estádio do tumor** (tabela 3).

2.1.1.1 – Classificação histológica

Tabela 1. WHO Classificação Histológica do Carcinoma de Vesícula Biliar³¹

1. Carcinoma *in situ*
 2. Adenocarcinoma
 3. Adenocarcinoma papilar
 4. Adenocarcinoma tipo intestinal
 5. Adenocarcinoma mucinoso
 6. Adenocarcinoma de células claras
 7. Carcinoma com células em anel-de-sinete
 8. Carcinoma adenoescamoso
 9. Carcinoma de células escamosas
 10. Carcinoma de pequenas células (oat cell carcinoma)
 11. Carcinoma indiferenciado
-

Mais de 80% dos tumores malignos da vesícula biliar são adenocarcinomas, em torno de 6% são carcinomas indiferenciados, 3% carcinomas de células escamosas e 11% correspondem a outros tipos histológicos menos freqüentes⁴⁰.

Do ponto de vista histológico, o tipo de tumor tem influência na sobrevida. Os pacientes portadores de adenocarcinoma papilar, geralmente, apresentam sobrevida média de 20 meses após o diagnóstico, enquanto portadores de outros tipos histológicos sobrevivem em torno de 03 meses. Entretanto, embora este tumor esteja associado a um melhor prognóstico, não é

um tipo histológico freqüente, correspondendo a aproximadamente 5,8% dos casos de carcinoma de vesícula. O carcinoma de pequenas células têm um péssimo prognóstico, e corresponde a aproximadamente 4% dos carcinomas de vesícula e o tipo indiferenciado a 10% desta neoplasia. O carcinoma com células em anel-de-sinete também é pouco freqüente e apresenta um prognóstico bastante reservado^{31,58}.

2.1.1.2 – Grau histológico

O grau histológico (tabela 2) do tumor também influencia a sobrevida dos pacientes, sendo que portadores de tumor grau 1 sobrevivem, em média, 7 meses após o diagnóstico, enquanto pacientes com adenocarcinoma grau 3 e os carcinomas indiferenciados sobrevivem, geralmente, somente até 3 meses após o diagnóstico³¹.

Tabela 2. Grau Histológico dos tumores de vesícula biliar³¹

Grau X - Grau não pode ser avaliado

Grau 1 - Bem diferenciado : adenocarcinomas compostos de mais de 95% de glândulas

Grau 2 - Moderadamente diferenciado: carcinomas compostos de 50 a 95% de glândulas

Grau 3 - Pouco diferenciado: carcinomas compostos de 5 a 49% de glândulas

2.1.1.3 – Invasão vascular

A presença de invasão vascular identificada ao exame histológico é um indicativo de prognóstico menos favorável, com índices de sobrevida em 5 anos em torno de 13%, enquanto este índice pode alcançar 31% nos pacientes em que a invasão vascular não está presente³¹.

2.1.1.4 – Estadiamento TNM

A classificação TNM possibilita um melhor estadiamento da doença e facilita a avaliação dos resultados do tratamento cirúrgico e, de certa forma, a avaliação do prognóstico dos pacientes portadores desta neoplasia maligna, podendo ser vista detalhadamente na tabela 3.

Existe relação direta entre a extensão do comprometimento da parede vesicular e o grau de disseminação do tumor. Assim, a sobrevida em 5 anos para tumores restritos à mucosa é de aproximadamente 50%, o que contrasta com valores entre 25% e 4% relatados para tumores de vesícula que invadem a camada muscular e subserosa, respectivamente²⁵.

Embora o tipo histológico e o grau sejam fatores prognósticos úteis, o estágio da doença é, provavelmente, o mais confiável fator prognóstico na opinião da maioria dos autores^{31,47}. Os melhores resultados, em termos de sobrevida, são observados em pacientes com carcinoma *in situ* ou precoce cujo diagnóstico é feito em espécimes retiradas por colelitíase³¹.

Embora para várias neoplasias malignas humanas como o carcinoma de mama³⁷, pulmão²³ e cólon-retal²⁴, uma angiogênese intratumoral elevada tenha sido associada com pior prognóstico, para os tumores do trato biliar, este aspecto permanece, ainda, pouco explorado.

Estas observações demonstram, claramente, o benefício da detecção precoce desta afecção. Infelizmente, um método para a detecção precoce do carcinoma de vesícula ainda não é disponível. Estudos recentes⁶⁹ têm sido realizados no intuito de identificar marcadores tumorais circulantes para esta neoplasia, mas com resultados pouco alentadores. Sem dúvida, o estudo dos fatores de risco parece ser, ainda, o foco primordial, porém a busca de terapias alternativas têm sido muito incrementado com o avanço no desenvolvimento de drogas antiangiogênicas para tratamento desta e outras neoplasias em fase avançada.

Tabela 3. Classificação TNM e pTNM do Carcinoma de Vesícula Biliar (American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer 2004)⁶².

Tumor Primário (T)	Tx – O tumor primário não pode ser avaliado			
	T0 - Não há evidência de tumor primário			
	Tis - Carcinoma <i>in situ</i>			
	T1 - Tumor invade lâmina própria ou camada muscular			
	T1a - Tumor invade lâmina própria			
	T1b - Tumor invade camada muscular			
	T2 - Tumor invade tecido conectivo perimuscular; não há extensão além da serosa ou para o fígado			
	T3 - Tumor ultrapassa serosa, invasão de 2 cm ou menos do fígado e/ou direta à 1 órgão adjacente, ou ambos.			
	T4 - Tumor se estende mais de 02 cm para o fígado e/ou para 02 ou mais órgãos adjacentes.			
Linfonodos regionais (N)	Nx - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados			
	N0 - Nenhum linfonodo metastático			
	N1 - Metástase em linfonodos do cístico, pericoledocianos e/ou hilares (isto é, no ligamento hépato-duodenal).			
	N2 - Metástases em linfonodos peripancreáticas, periduodenais, periportal, celíaco e/ou mesentéricos superiores.			
Metástase à distância (M)	MX - Presença de metástase à distância não pode ser avaliada.			
	M0 - Ausência de metástase à distância			
	M1 - Metástase à distância			
Estadiamento	Estágio 0	Tis	N0	M0
	Estágio I	T1	N0	M0
	Estágio II	T2	N0	M0
	Estágio III	T1,T2	N1	M0
		T3	N0,N1	M0
	Estágio IVA	T4	N0,N1	M0
	Estágio IVB	qualquer T	N2	M0
		Qualquer T	qualquer N	M1

pTNM – Classificação Patológica – As categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M. pN0: o exame histológico do espécime de uma linfadenectomia regional Incluirá, geralmente, 3 ou mais linfonodos.

2.2 - ANGIOGÊNESE

A angiogênese consiste na formação de novos vasos a partir da vasculatura pré-existente. Neste processo ocorrem múltiplas etapas, seqüenciais e interdependentes, iniciando-se com a degradação da membrana basal que circunda os capilares, seguida da invasão do estroma circunjacente em direção ao estímulo angiogênico. A migração das células endoteliais é acompanhada pela sua proliferação e organização em estruturas tridimensionais, as quais se ligam a outras estruturas similares e formam uma rede de novos vasos. Um fator angiogênico é aquele capaz de promover uma alteração seletiva das características das células endoteliais e das estruturas perivasculares associadas (como pericitos e células musculares lisas dos vasos) sem afetar a função de outros tipos de células⁶³.

Nas últimas duas décadas, mais de 20 fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias têm sido identificadas como possuidoras de atividade pró-angiogênica e um número razoável de inibidores deste processo também foram identificados. Os principais fatores angiogênicos identificados podem ser observados na tabela 4^{17,26}.

A angiogênese é um processo fundamental ao crescimento tumoral e foi descrito por Folkman¹⁶ que primeiro postulou, em 1971, que tumores sólidos poderiam permanecer dormentes até um tamanho de 2 a 3mm, na ausência de neovascularização, sendo seu tamanho limitado pela difusão de oxigênio e nutrientes dos tecidos circunjacentes. Pesquisas subsequentes conforme revisão realizada por este mesmo autor, em 1990, mostraram evidências claras, tanto em estudos experimentais quanto em humanos, que o crescimento tumoral é “angiogênese-dependente”¹⁷. As células tumorais podem superexpressar fatores angiogênicos estruturalmente ou responder a estímulos externos para que eles se expressem. O principal estímulo externo para a expressão destes fatores é a hipóxia, que induz uma cascata de vias de sinalização que levarão ao aumento da transcrição de vários fatores angiogênicos^{6,15,50}.

Diferente do que ocorre em condições fisiológicas, o delicado equilíbrio da modulação entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos está alterado no “ambiente tumoral”, o que

afeta a função de diversos tipos celulares e pode induzir ao crescimento vascular anormal. Além disso, é fato conhecido que a proliferação das células endoteliais associada à neovasculatura tumoral ocorre 20 a 2000 vezes mais rapidamente que aquela observada na vasculatura dos tecidos normais³³. Também, as características dos microvasos nos tumores são diferentes daquelas apresentadas pelos vasos em condições fisiológicas normais.

Desta forma, o processo de neoformação vascular é necessário não só para o crescimento tumoral, mas também para a progressão inicial de lesões pré-malignas para o câncer, na disseminação de células tumorais para a circulação sanguínea e no crescimento de micrometástases dormentes para lesões francamente metastáticas^{18,36,44,50}.

Tabela 4. Fatores angiogênicos

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
Fator de crescimento placentário
BFGF: fator de crescimento básico dos fibroblastos
AFGF: fator de crescimento ácido dos fibroblastos
FGF-3: fator de crescimento dos fibroblastos-3
FGF-4: fator de crescimento dos fibroblastos-4
EGF: fator de crescimento epidérmico
TGF- α : fator de crescimento transformante alfa
TGF- β : Fator de crescimento transformante beta
HGF/SF: fator de crescimento dos hepatócitos/fator cicatricial
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
G-CSF: fator estimulador das colônias de granulócitos
IL-8: Interleucina-8
Pleiotropina
PD-ECGF: fator de crescimento endotelial derivado das plaquetas
Angiogenina
Proliferina

Na última década, observa-se uma dicotomia no que se refere às pesquisas da angiogênese no câncer: por um lado a busca da quantificação da angiogênese para uso no diagnóstico e prognóstico tumoral e, por outro lado, a tentativa de inibição da angiogênese para frear o crescimento tumoral. Atualmente, observa-se progresso significativo em ambas direções. Vários agentes antiangiogênicos têm sido testados em ensaios clínicos e o papel da terapia antiangiogênica têm sido revisada em recentes artigos^{6,15,50}. O objetivo desta nova modalidade terapêutica é induzir a regressão tumoral e impedir sua disseminação metastática por bloqueio do fornecimento de nutrientes e oxigênio às células neoplásicas¹⁹.

Além de objetivar-se a inibição da atividade de agentes pró-angiogênicos ou utilizar-se de agentes inibidores da angiogênese, um outro aspecto novo sob pesquisa é a busca de um alvo seletivo em células endoteliais, dentro dos vasos sangüíneos neoformados associados ao tumor. Entretanto, até o momento, nenhum marcador específico de proliferação de células endoteliais ou moléculas capazes de identificar entre células endoteliais de vasos sangüíneos de tecidos normais ou neoplásicas, têm sido identificados. Sabe-se, porém, que as células endoteliais da vasculatura tumoral apresentam uma proliferação mais rápida que as células endoteliais quiescentes da vasculatura de tecidos normais. Assim, moléculas superexpressas em células endoteliais ativamente proliferativas, como o CD105, representam possíveis alvos para terapêutica antiangiogênica.

2.2.1 - Métodos de avaliação da angiogênese

Embora seja reconhecido há muitos anos que o tecido neoplásico é mais densamente vascularizado que o tecido normal, somente depois da hipótese de Folkman¹⁶ sobre a antiangiogênese é que métodos quantitativos para medir a angiogênese em lâminas de tecido, passaram a ser propostos. Estes autores identificaram a importância que a quantificação angiogênica da vasculatura tumoral pode desempenhar no manejo dos pacientes e desenvolveram um sistema de graduação da angiogênese no microscópio (MAGS system: microscopic angiogenesis grading system) em secções de tecidos corados, baseada no número de vasos, no grau de hiperplasia das células endoteliais e na sua citologia⁶. Entretanto, as limitações técnicas do uso de um único corte, as variações inter e intraobservadores e problemas de conceitos biológicos demonstraram que esta não era uma técnica facilmente reprodutível²⁸.

O interesse pela quantificação da angiogênese tumoral começou a reaparecer, somente nos últimos anos, com a identificação de marcadores endoteliais mais específicos como o CD31, CD34 e CD105, conseqüentemente, novos métodos de quantificação têm sido propostos.

A maior parte dos estudos tem empregado o método baseado no trabalho pioneiro de Weidner et al⁶⁶. Utilizando a técnica imuno-histoquímica que cora os vasos intratumorais, através da utilização de um determinado anticorpo para células endoteliais, a densidade de microvasos é avaliada, nas áreas mais vascularizadas do tumor. Entretanto, devido a diferentes técnicas empregadas e problemas de metodologia, vários pesquisadores não têm obtido êxito em confirmar a hipótese de que tumores densamente vascularizados estejam associados à redução da sobrevida²¹.

Assim, os resultados contraditórios que se observam na literatura, em relação a diferentes tumores malignos em humanos, podem estar associados a aspectos técnicos e metodológicos que serão expostos a seguir.

2.2.1.1 - Anticorpo primário

A escolha do anticorpo primário irá influenciar, diretamente, no número de vasos avaliados, dependendo da especificidade do mesmo para células endoteliais de vasos neoformados.

O anticorpo para o fator VIII_Ag identifica somente uma proporção do endotélio vascular, podendo subestimar a verdadeira extensão da microvasculatura. Além disso, também identifica linfáticos endoteliais, ao contrário do JC70⁴².

Anticorpos anti-CD31 e JC70 reconhecem a maioria dos capilares, e apresentam boa coloração em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina²¹. Estudos que compararam o fator VIII e o CD31 observaram que ambos fornecem informações prognósticas²¹, além disso, existe uma significativa associação entre a média e mediana, na contagem dos vasos, o que sugere que as diferenças nos resultados observados se devam, principalmente, a diferentes métodos utilizados para quantificação (contagem) dos vasos intratumorais.

O CD34 é, atualmente, considerado um ótimo marcador para estudos de quantificação da angiogênese decorrente da sua facilidade de uso e boa reatividade imuno-histoquímica, superando o CD31. Entretanto, o CD34 é um marcador pan-endotelial e normalmente reage com células endoteliais de grandes vasos, apresentando menor especificidade que o CD105 para vasos neoformados³⁶. Estudos em diferentes neoplasias têm sugerido que escores de densidade vascular intratumoral, utilizando imuno-histoquímica com CD105, podem ser superiores (maior especificidade) àqueles escores obtidos usando o CD34, em termos de informação prognóstica^{36,59}.

A expressão do CD105 está restrita basicamente, às células endoteliais vasculares, nas quais altos níveis desta proteína são detectáveis, ou seja, apresentam alto índice de proliferação. Em tumores malignos sólidos, o CD105, expressa-se, quase exclusivamente, nas células endoteliais dos vasos sanguíneos peri e intratumorais, apresentando, assim, maior especificidade que os demais^{15,19,20}. Este marcador será descrito, detalhadamente, adiante.

2.2.1.2 - Área e magnificação

A maioria dos estudos seleciona apenas um bloco representativo do tumor, no qual é identificada uma área ótima para quantificação da vasculatura, uma vez que existem evidências de forte concordância no número de vasos, em diferentes blocos do mesmo tumor^{12,22}.

A magnitude do aumento utilizado irá determinar variabilidade no número de vasos identificados, uma vez que maiores resoluções proporcionarão a identificação de maior número de vasos. Além disso, e de fundamental importância, é a seleção dos denominados “hot-spots”, que são as áreas identificadas como de maior densidade vascular peri e intratumorais, selecionados para a contagem em uma mesma lâmina. Quanto menor o número de “hot-spots” selecionados, possivelmente, menor seja o número de vasos contados. A seleção destas áreas de maior densidade vascular intratumoral (“hot-spot”) é realizada por se supor que estas regiões apresentem maior importância biológica, possivelmente por apresentarem clones de células tumorais com elevado potencial angiogênico e, conseqüentemente, maior probabilidade de disseminação²². Embora as áreas “hot-spots” possam ocorrer dentro da massa tumoral, com freqüência estão localizadas na periferia do tumor, onde a angiogênese é mais ativa. Desta forma, é fundamental que se inclua a interface tumoral, junto ao tecido normal, no bloco selecionado para exame²¹ (figura 2).

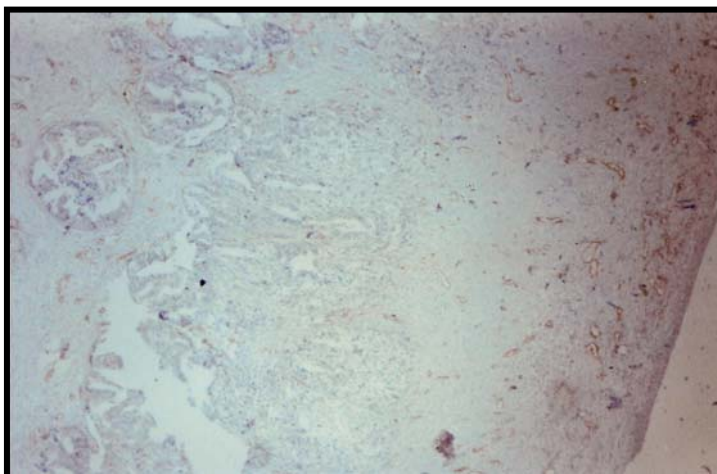


Figura 2. Adenocarcinoma de vesícula biliar mostrando intensa vascularização na periferia do tumor (imunohistoquímica CD105-40x)

2.2.1.3 - Método de contagem

A natureza laboriosa da contagem de microvasos intratumorais, problemas com a reprodutibilidade somados a dificuldade conceitual de microvasos adjacentes e diferentes parâmetros vasculares adotados, geraram grande variabilidade nas técnicas de contagem adotadas por diferentes grupos de pesquisa²⁸. A tentativa de automatização do método têm sido realizada, porém a dependência da coloração dos tecidos, intensidade da reativação antigênica, dificultam a definição de parâmetros para identificação de imagens e colorações nos diferentes sistemas testados. Desta forma, a contagem manual pelo observador, no microscópio, selecionando os “hot-spots” (em menor aumento) e após realizando a contagem dos microvasos, em cada campo (maior aumento), ainda é a base da maior parte das técnicas adotadas, embora não haja uma padronização destas etapas. O método de Chalkley⁹, que utiliza uma lente com 25 pontos randomizados, e utilizada em nossa pesquisa, será descrito adiante.

2.2.1.4 - Experiência do observador

A experiência do observador parece influenciar diretamente o sucesso da identificação e seleção dos “hot-spots”. Observadores inexperientes tendem a selecionar áreas com capilares dilatadas ou com fibrose e necrose, que devem ser ignoradas⁴. Luz vascular ou presença de eritrócitos não é necessária quando se considera um vaso como contável, e além disso, muitos microvasos apresentam uma configuração alterada, apresentando-se colapsados na lâmina examinada²¹.

O passo mais subjetivo destes procedimento de contagem é a escolha do “hot-spot”, uma vez que a seleção inadequada destes campos, poderá determinar a classificação inadequada do paciente em um determinado grupo prognóstico.

2.2.1.5 - Ponto de corte para análise estatística

O objetivo final quando avaliamos a densidade vascular tumoral é determinar um valor (ponto de corte) onde se observe mudança no parâmetro analisado, na maior parte das vezes, a sobrevida. A escolha do ponto de corte, definido por média, mediana ou tercis, resultará em diferentes conclusões a partir da análise dos mesmos dados, dependendo do valor ou parâmetro definido^{21,22}.

2.3 - CD105 (Endoglina)

O CD105 (endoglina) é uma glicoproteína expressa na superfície da célula (membrana) sendo um componente do complexo receptor do TGF- β (Fator de Crescimento transformante)³². O TGF- β é um dos fatores de crescimento que regula várias funções celulares incluindo a proliferação, diferenciação, migração, síntese da matriz extra-celular e hematopoiese, estando particularmente envolvida na angiogênese^{5,27}.

Em humanos, o gene CD105 está localizado no cromossoma 9q34. Ríus et al.⁵³ demonstraram haver indução deste gene na presença de TGF- β 1. Mutações do gene CD105 estão associadas com a telangectasia hemorrágica hereditária, uma desordem vascular autossômica dominante caracterizada pela presença de mal-formações artério-venosas e sangramentos freqüentes. Elevados níveis de expressão do CD105 são detectáveis no endotélio microvascular humano e nas células endoteliais dos vasos em tecidos submetidos à intensa angiogênese, como os tecidos cicatriciais, inflamatórios e tumorais^{20,46}. No entanto, o CD105 também pode se expressar fracamente em algumas células não endoteliais de diferentes tipos histológicos como as células mesenquimais cardíacas, macrófagos diferenciados, fibroblastos, células mesangiais e está ausente ou pode ser encontrado em escassa quantidade em células endoteliais linfáticas da pele de humanos.¹⁹.

Em tumores malignos sólidos, o CD105, quase exclusivamente, expressa-se nas células endoteliais dos vasos sangüíneos peri e intratumorais e em componentes do estroma tumoral^{15,19,20}. Além disso, pequenos e, provavelmente, vasos tumorais imaturos (alto índice de proliferação) são principalmente corados por anticorpos monoclonais anti-CD105, como demonstrado em tumores de próstata⁶⁷ e mama¹⁴.

Embora em baixa freqüência, a expressão do CD105 também foi observada no citoplasma de células tumorais em meningiomas, sarcomas, tumores de ovário e carcinoma de mama²⁰. No melanoma este receptor foi identificado em 25% dos tumores primários e em 34% das lesões metastáticas, sendo que a maioria das células metastáticas mostrou um grau variável de expressão do CD105¹⁹.

De acordo com a noção de que a angiogênese é regulada positivamente pela hipóxia e que o CD105 é superexpresso na neovasculatura de tecidos angiogênicos, foi demonstrado que níveis de ativação de CD105 são moderadamente regulados por hipóxia, via fator indutor de hipóxia (HIF-1) e que condições de hipóxia e TGF- β 1 cooperam para induzir a expressão de CD105^{19,70}.

Muitos estudos têm definido o papel do CD105 como um poderoso marcador para quantificar a densidade de microvasos intratumoral em tumores sólidos e hematopoiéticos incluído o tumor de mama, próstata, cólon-retal, tumor de pulmão (não de pequenas células) e mieloma múltiplo^{1,59,67}. Um incremento da densidade vascular, identificada através de técnica imuno-histoquímica utilizando anticorpos anti-CD105, foi encontrado durante a progressão de estágios da carcinogênese cólon-retal, sugerindo que a taxa de neovascularização pode representar um preditor de desenvolvimento do câncer cólon-retal¹. Além disso, a densidade de microvasos intratumoral, determinada usando anticorpos anti-CD105 tem demonstrado ser um indicador prognóstico independente para algumas neoplasias malignas, sendo que uma densidade microvascular intratumoral aumentada se correlaciona diretamente com menor sobrevida^{15,41}. De fato, a densidade microvascular intratumoral têm sido extensamente investigada e foi demonstrado ser um útil marcador prognóstico em muitos tipos de neoplasias³⁵.

Experimentos realizados em modelos animais com neoplasia de mama e cólon, utilizando o anticorpo anti-CD105 conjugado com imuno-toxinas e imuno-radioisótopos demonstraram uma eficiente supressão do crescimento tumoral, sem significativos para-efeitos sistêmicos¹⁵.

2.4 – Índice de Chalkley

Para que se possa identificar a microvasculatura tumoral, é necessário que seja realizada a técnica imuno-histoquímica, nos cortes a serem examinados, utilizando o anticorpo primário específico (anticorpo anti-CD105 ou anti-CD34), que evidencia os vasos intra-tumorais, corando-os em marron. A técnica de Chalkley consiste na utilização de uma lente com 25 pontos, distribuídos randomicamente em uma área específica ($0,196\text{mm}^2$) (figura 3), que é inserida na ocular do microscópio, permitindo a sua rotação para melhor posicionamento, se necessário. Em menor aumento (100x), o “hot-spot” é selecionado. A seguir, em maior aumento (200x) posiciona-se a lente e a lâmina, até que o maior número de pontos coincida com o maior número de vasos, grupo de células endotélias ou dentro da luz de microvasos coradas. Os pontos coincidentes são contados em 3 “hot-spots” para cada caso, e a média dos três campos corresponderá ao índice de Chalkley (figura 4).

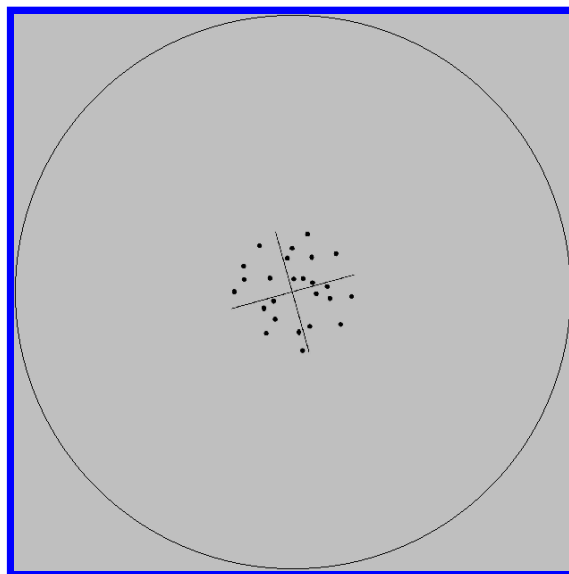


Figura 3. Ilustração da Graticula de Chalkley.
Área $0,196\text{mm}^2$

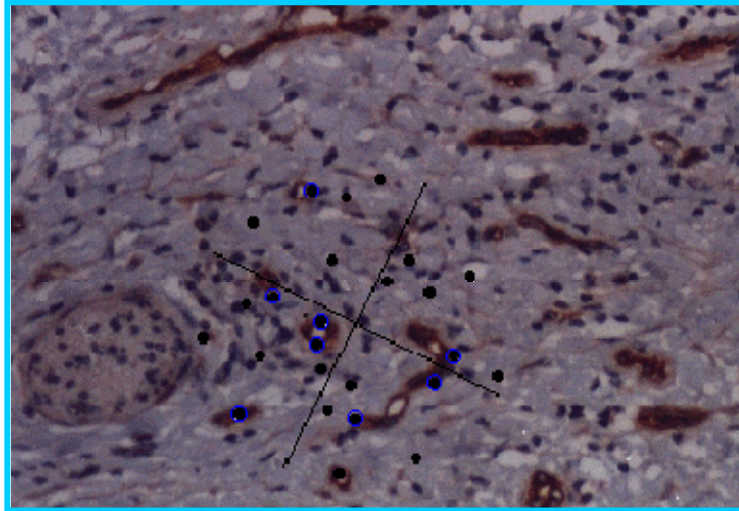


Figura 4. Exemplo (ilustrado) da graticula de Chalkley aplicada à um hot-spot (anticorpo anti-CD105;200X) em um adenocarcinoma de vesícula biliar. Os pontos coincidentes com microvasos corados estão marcados com círculos azuis.

Esta técnica tem abolido um dos passos altamente observador-dependente na medida da densidade microvascular, que é a freqüente decisão que o observador deve fazer em relação a identificação de dois vasos, se são estruturas separadas ou uma reflexão do mesmo vaso, pois todo ponto coincidente com a parede do vasos, grupo de células endoteliais, ou luz de vasos corados, devem ser contados.

Hansen e col²⁹, demonstraram a importância da padronização de uma metodologia para a avaliação da angiogênese. Estes autores utilizaram o Índice de Chalkley em 836 pacientes portadores de carcinoma de mama, para quantificação da angiogênese e avaliação do valor prognóstico deste índice. Independente de outros fatores prognósticos associados ao câncer de mama, um risco acima de 57% de morte foi observado quando o tumor tinha uma Índice de Chalkley maior ou igual a 5 e menor que 7. Um risco 125% maior de morte foi associado com um índice de Chalkley maior ou igual a 7. O Índice de Chalkley predice a sobrevivência global e tempo livre de doença, tanto em grupos de pacientes com linfonodos negativos como

positivos. Este estudo confirmou que a estimativa da angiogênese, utilizando o método de Chalkley para contagem, têm valor prognóstico independente nos portadores de carcinoma de mama.

Este método foi proposto como padrão para avaliação da microdensidade vascular intratumoral em tumores malignos sólidos pelo "Second international Consensus on the methodology and Criteria of Evaluation of Angiogenesis Quantification in solid Human Tumors"⁶⁴.

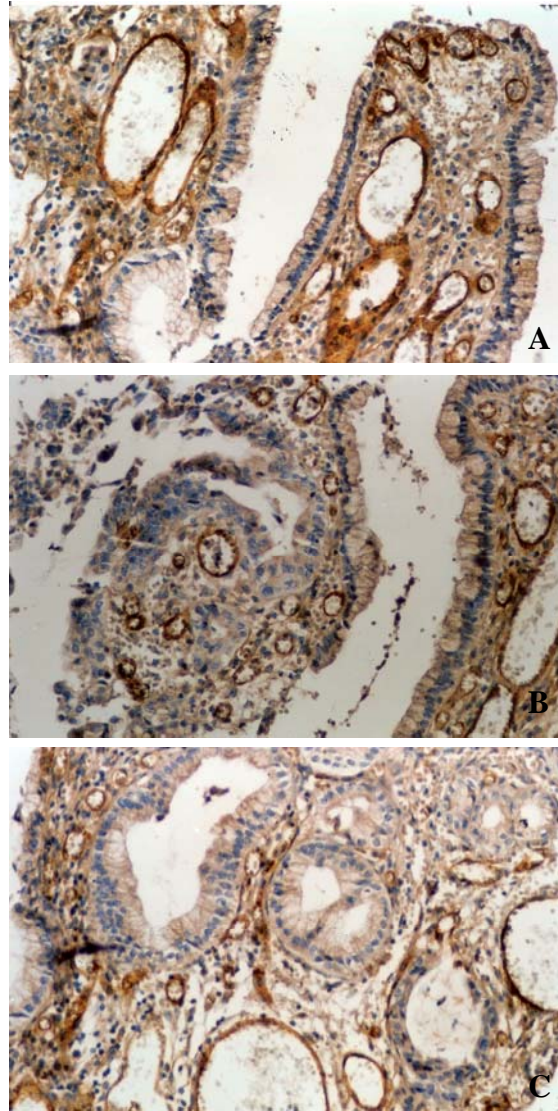


Figura 4. Três hot-spots selecionados em Adenocarcinoma de vesícula moderadamente diferenciado (imunohistoquímica para CD105 – 100X).

2.5 - Angiogênese e carcinoma de vesícula biliar

Embora para várias neoplasias malignas humanas a densidade vascular intratumoral aumentada esteja associada com piores prognósticos, na neoplasia de vesícula biliar este fato não está estabelecido. Além disso, poucos estudos foram realizados para avaliar a importância da angiogênese no carcinoma de vesícula^{25,26,41,48,52,57,61}, com resultados divergentes.

Sugawara et al.⁵⁷ (1999), utilizaram o CD34 para avaliar a densidade microvascular intratumoral em 40 casos de carcinoma de vesícula, e não observaram associação entre a neovascularização e o prognóstico tumoral, sugerindo que a angiogênese intratumoral apresenta importância limitada na disseminação e crescimento desta neoplasia. Estes autores, consideraram, para avaliação da densidade, todos os microvasos observados, independente da presença de luz, e a presença de células endoteliais isoladas ou em grupo, em três campos selecionados. Excluíram da contagem vasos maiores, com luz maior que aproximadamente o tamanho de oito células coradas. Além disso, o CD34 é um marcador celular pan-endotelial, não sendo capaz de refletir a atividade angiogênica tumoral exata³⁶. Outros pesquisadores, porém, relatam associação entre outros fatores angiogênicos e o carcinoma de vesícula. Assim, Okita et al.⁴⁸ (1998) encontraram associação entre a expressão do VEGF e a progressão tumoral nesta neoplasia. Hida et al.³⁴ (1999) encontraram associação entre VEGF e mau prognóstico em carcinomas de via biliar extra-hepática.

Gohongi et al.²⁶ (1999) também observaram expressão de TGF- β 1 nas células tumorais do epitélio em poucos casos de carcinoma de vesícula biliar, independente do tipo histológico avaliado.

O valor da angiogênese para prever o prognóstico de pacientes portadores de carcinoma de vesícula estágios I a III, submetidos à colecistectomia simples, foi estudado por Giatromanolaki et al.²⁵ (2002). A microvasculatura tumoral foi avaliada em 48 casos, utilizando o CD31. Estes autores observaram que uma densidade vascular alta definiu mau prognóstico, mesmo em portadores de carcinomas bem diferenciados e propõe que a densidade microvascular intratumoral seja considerada um fator prognóstico independente para esta

neoplasia. Convém ressaltar, que o CD31 apresenta menor especificidade para vasos neoformados que o CD105, embora reconheça a maioria dos capilares e apresente confiável imuno-coloração de microvasos em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina. Um outro aspecto, é que estes pesquisadores definiram como microvasculatura contável apenas vasos com luz bem definida, descartando agrupamentos de células endoteliais ou células isoladas além de não utilizarem um método padrão de contagem.

Kitamura et al.⁴¹ em 2003 estudaram a expressão do TGF- β em 45 casos de carcinoma de vesícula, buscando associação com a proliferação celular (Ki-67), angiogênese (CD-34 e CD105) e infiltração celular tumoral (TAM). A expressão do TGF- β foi observada em 25 casos, havendo diferença estatisticamente significativa em relação ao aumento da proliferação vascular tumoral (CD105) no grupo positivo (expressam o TGF- β). Esta diferença não foi observada com o CD34. Entretanto, este dados devem ser analisados com parcimônia, uma vez que este autor não descreve os critérios utilizados na definição do ponto de corte utilizado para separar os grupos de alta, média e baixa densidade vascular. Além disto, não foi utilizada a técnica de consenso atual para a contagem da densidade microvascular tumoral (método de Chalkley), que diminui os problemas de aferição desta medida. Este estudo não pesquisou a associação da densidade vascular e sobrevida dos pacientes.

Kalekou and Miliaras³⁹ (2004), observaram associação entre o aumento progressivo da densidade vascular tumoral e o aumento da profundidade de invasão tumoral na parede da vesícula biliar, ao estudar 33 casos de carcinoma deste órgão. Concluíram, a partir de seus resultados, que a densidade vascular está envolvida na evolução do carcinoma de vesícula. Resultado completamente diverso foi descrito por Giatromanolaki et al.²⁵, que afirmam não haver, definitivamente, associação entre a profundidade da invasão e a angiogênese. O marcador vascular utilizado por Kalekou and Miliaras³⁹ foi o fator VIIIaG, que identifica, como descrito anteriormente, apenas uma proporção do endotélio vascular, podendo subestimar a verdadeira extensão da microvasculatura. Além disso, também identifica linfáticos endoteliais.

Tian et al.⁶¹ (2006) analisaram a densidade vascular no carcinoma de vesícula utilizando o fator VIIIaG, buscando associação com a expressão do VGF e p53. Este autor observou uma

maior densidade vascular nos tumores em estágios mais avançados. Utilizou a contagem de vasos em 5 campos de alta densidade vascular (aumento de 200x), para cada caso, calculando a média após. Considerou como microvaso para a contagem a presença de uma única célula endotelial corada pela técnica imuno-histoquímica ou grupo de células que estivessem claramente separadas por vasos adjacentes, células tumorais ou outro tecido conectivo.

Como se pode observar, poucos estudos avaliaram a densidade vascular, no carcinoma de vesícula, através da contagem de vasos em “hot-spot”, utilizando anticorpos primários com grau variável de especificidade para vasos neoformados. O número de “hot-spots” selecionados variou nos estudos descritos, assim como o anticorpo primário selecionado, o aumento microscópico utilizado para aferição dos dados, e principalmente, a definição de quais estruturas devem ser contadas. Esta grande variabilidade na metodologia utilizada, certamente reflete-se na discordância dos resultados e conclusões observados. A necessidade de padronização metodológica é premente, em relação a todos estes aspectos citados, e esforços iniciais têm sido realizados por alguns pesquisadores que elaboraram um Consenso Metodológico para Quantificação da Angiogênese⁶⁴, ainda não adotado por todos. O que se espera é que uma metodologia seja estandardizada por consenso, como o método de Chalkey e que a seleção do anticorpo mais específico também seja definida. Estas são condições fundamentais para serem executadas em pesquisas, não só para que se possa estabelecer com mais segurança o prognóstico das neoplasias malignas, mas para o desenvolvimento de terapias antiangiogênicas, dependentes da identificação de um alvo específico para células endoteliais de vasos intratumorais.

Estas observações, motivaram a nossa pesquisa para avaliar o valor da densidade vascular intratumoral, utilizando o método de Chalkley, na determinação do prognóstico dos portadores de carcinoma de vesícula, não havendo, segundo nossa pesquisa, trabalho semelhante, descrito na literatura.

3. OBJETIVOS

3.1. PRINCIPAL

- Avaliar a densidade vascular intratumoral pelo método de Chalkley, utilizando o anticorpo-antiCD105, em espécimes cirúrgicos de neoplasia maligna da vesícula biliar.

3.2. SECUNDÁRIOS

- Avaliar a associação entre a densidade microvascular intratumoral e a sobrevida dos pacientes.
- Definir um ponto de corte na densidade vascular deste grupo, baseado na sobrevida destes pacientes.
- Pesquisar a associação entre a densidade vascular intratumoral e os fatores prognósticos avaliados (tipo histológico, grau histológico e estadiamento pelo sistema pTNM).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131(1): 109-113.
2. Atlas de Mortalidade por Cancer: *Inca* 1995-1999. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 2000.
3. Barbosa-Coutinho LM, Arnt RA, Rocha JL, et al. Carcinoma de vesícula biliar: estudo de 26 casos. *R. AMRIGS* 1992; 36(1): 9-14.
4. Barbareschi M, Weidner N, Gasparini G, et al. Microvessel quantitation in breast carcinomas. *Appl Immunochem* 1995; 3: 75-85.
5. Blobel GA, Schlemmer WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342(18): 1350-58.
6. Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concepts to therapeutic trial. *Cancer Control* 1999; 6(5): 436-58.
7. Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histological grading. *J Natl Cancer Inst* 1972; 347-356.
8. Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gotlieb SLD, Souza JMP. Câncer no Brasil - Dados Histopatológicos - 1976—1980, Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1982.
9. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of Tissues. *J Nat Cancer Inst* 1943; 4: 47-53.
10. Cunha JE, Penteadó S, Jukemura J. Neoplasias da Vesícula biliar. In Kalil AN, Coelho J, Strauss E eds. *Fígado e Vias Biliares-Clinica e Cirurgia*. Editora Revinter R Ltda, Rio de Janeiro 2001:650-57.
11. da Rocha, AO; Coutinho LMB; Scholl JG; Leboutte LDP. The value of p53 protein expression in gallbladder carcinoma: Analysis of 60 cases. *Hepato-Gastroenterology* 2004; 51: 1810-1814.
12. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Lab Invest* 1995; 73:9226.

13. Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH, Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma, *Am J Pathol* 1993; 143: 381-89.
14. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2[?]tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Human Pathol* 2004; 35:176-183
15. Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003; 17: 984-92.
16. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 82-86.
17. Folkman J. Whats is the evidence that the tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
18. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl Med* 1995; 333: 1757-63.
19. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, et al. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessel. *Oncogene* 2003; 22: 6557-63.
20. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2(1):18.
21. Fox SB; Harris AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Investigational New Drugs* 1997; 15: 15-28.
22. Fox SB; Harris AL. Histological quantification of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004; 112 (7-8): 413-430.
23. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Angiogenesis is a significant prognostic marker in operable non small cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 86: 1421-1430.
24. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, et al. Combined role of angiogenesis, bcl-2 and p53 expression in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1999; 86: 1421-1430.
25. Giatromanolaki A; Sivridis E; Koukourakis MI; et al. Prognostic role of angiogenesis in operable carcinoma of the gallbladder. *Am J Clin Oncol* 2002; 25(1): 38-41.

26. Gohongi T, Boucher Y, Yun CO, et al. Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor β 1. *Nat Med* 1999; 5: 1203-8.
27. Gold LI, Parekh TV. Loss of growth regulation by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancers: studies on endometrial carcinoma. *Sem Reprod Med* 1999; 17(1): 73-92.
28. Hansen S, Grabau DA, Rose C, et al. Angiogenesis in breast cancer. A comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. *Lab Investig* 1998; 78: 1563-1573.
29. Hansen S; Grabau DA; Sorensen FB; et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkely counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:139-146.
30. Hasegawa H, Veo H, Nanbara S, et al. Effective preoperative chemoimmunotherapy regimen against advanced gallbladder carcinoma: a case report. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1369-42.
31. Henson DE; Albores-Saavedra J; Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6):1493-1497.
32. Hentges S, Sarkar DK. Transforming growth factor- β regulation of estradiol-induced prolactinomas. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2001; 22: 340-63.
33. Herlyn M. Endothelial cells as targets for tumor therapy. *J Immunother* 1999; 22: 185.
34. Hida Y, Morita T, Fujita M, et al. Vascular endothelial growth factor expression is an independent negative predictor in extrahepatic biliary tract carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 2257-2260.
35. Hlatky L, Hahnfedt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-893.
36. Ho J W; Poon RT; Sun CK; et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11(2): 176-181.

37. Horak ER, LeeK R, Klenk N, et al. Angiogenesis assessed by palletelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
38. Jukemura J. Câncer de vesícula biliar. In:Gayotto LCC, Alves VAF eds. *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.1039-1047.
39. Kalekou H and Miliaras D. Immunohistochemical study of microvessel density, CD44 (standar form), p53 protein and c-erbB2 in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(7): 812-818.
40. Kaushik SP. Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8): 848-54.
41. Kitamura K, Kasuya K, Tsuchida A, et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta in gallbladder cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 327-32.
42. Kuzu I, Bickell R, Harris AL, et al. Heterogenity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumors. *J Clin Pathol* 1992; 45: 143-148.
43. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, et al. Epidemyology and molecular pathology of gallbladder cancer. *Cancer J Clin* 2001; 51: 349-364.
44. Liotta La, Stracke ML. Tumor invasion and metastases: biochemical mechanisms. *Cancer Treat Res* 1998; 40: 223-38.
45. Monteiro MC. Câncer da vesícula biliar. Análise de 100 casos operados. *Arq Bras Med* 1985; 59: 337-44.
46. Naef M, Ishiwata T, FriessH, et al. Differencial localization of transforming growth factor-beta isoforms in human gastric mucosa and overexpression in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 71: 131-37.
47. Nevin JE, Moran TJ, Kay S, et al. Carcinoma of the gallbladder: staging, treatment and diagnosis. *Cancer* 1976; 37: 141-8.
48. Okita S, Kondoh s, Shiraishi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor progression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 1998; 12: 1013-1018.

49. Pandey M, Pathak AK, Amitabh G. Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6): 1145-51.
50. Poon RT-P, Fan S-T and Wong J. Clinical Implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4): 1207-25.
51. Rashid A, Ueki T, Gao YT, et al. K-ras mutation, p53 overexpression, and microsatellite instability in biliary tract cancers: a population-based study in China. *Clin Cancer Res* 2002; 8(10): 3156-62.
52. Reiss M. TGF- β and Cancer. *Microbes Infect* 1999; 1: 1327-47.
53. Rius C, Smith JD, Almendro n, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998; 92: 4677-90.
54. Saetta A, Lazaris AC, Michalopoulos NV, et al. Genetic alterations involved in the development of gallbladder carcinomas from Greek patients. *Hepatogastroenterology* 2001; 48(41) 1284-48.
55. Shirai Y, Yoshida K, Tsukada K, et al. Radical surgery for gallbladder carcinoma. Long-term results. *Ann Surg* 1992; 216 (5): 565-568.
56. Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al. Risk factors for gallbladder cancer. An International collaborative case-control study. *Cancer* 1995; 76(10): 1747-56.
57. Sugawara Y, Makuuchi M, harihara Y, et al. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1682-86.
58. Sumiyoshi K, Nagai E, Chijiwa F. Pathology of carcinoma of the gallbladder. *World J surg* 1991; 15: 315-21.
59. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis. *Lung Cancer* 2003; 39: 289-96.
60. Tazuma S & Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3): 224-9.

61. Tian Y, Ding Ry, Zhi YH, et al. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for determination of tumor vascularity. *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 415-419.
62. TNM: Classificação de Tumores Malignos. 6^a ed. Ministério da Saúde – INCA, Rio de Janeiro, 2004.
63. Tomita S, Muto Y, Kusano T, et al. Genetic alterations in human malignant tumor. *Rinsho Byori* 1999; 47(1): 20-6.(summary -jpn).
64. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
65. Wanebo HJ. Carcinoma of gallbladder. *J Surg Oncol* 1993; 3 (supl.): 134-9.
66. Weidner N, Semple P, Welch W, et al. Tumor angiogenesis and metastases: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl Med* 1991; 324: 1-8.
67. Wikstrom P, Lissbrant IF, Sattin P, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51: 268-75.
68. Wistuba II, Sugio K, Hung J, et al. Allele specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res* 1995; 55: 2511-2515.
69. Yamamoto S, Fujii K, Kitadai Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor progression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 1998; 12(5):1013-1018.
70. Yukawa M, Fujimori T, Hirayama D, et al. Expression of oncogene products and growth factors in early gallbladder cancer, advanced gallbladder cancer, and chronic cholecystitis. *Hum Pathol* 1993; 24(1):37-40.
71. Ziliotto JA, Kunzle JE, Sgarbi EC. Carcinoma primário de vesícula biliar. *Rev Bras Cancerol* 1985; 31: 103-106.

ARTIGO 1- INGLÊS

Tumor Angiogenesis in Gallbladder Cancer

Authors: MD, MS, Andréa Oxley of Rocha

Surgeon of the General Surgery Department of the Hospital Mãe of Deus

MD, MS, PhD, Lígia Maria Barbosa Coutinho

Professor of Pathology of the Post-Graduate Program in Pathology of the Fundação

Federal Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brazil

MD, João Grigoletti Scholl

Adjunt Professor of Pathology of the Fundação Federal Faculdade de Ciências

Médicas de Porto Alegre, Brazil

Running title: angiogenesis and gallbladder cancer

Este artigo foi aceito para publicação, como capítulo do Livro "**Cancer of the Gallbladder Research**", escrito a convite do editor Dr. Frank Columbus.
New Science Publishers - NOVA EDITORIAL, NY
Previsão de publicação para dez/2006

ABSTRACT

Neovascularization of tumor tissue has been proposed as essential for tumor growth, proliferation and, eventually, metastasis. Although the intratumoral microvessel count in many human malignancies has been associated with the prognosis, little is known about its significance in gallbladder carcinoma. Besides, antibody targeting of tumor-associated vasculature is a promising therapeutic approach in human cancer, meanwhile, a specific cell membrane marker for endothelial cells of tumor vasculature has not been discovered yet. Endoglin (CD105) is a cell-surface glycoprotein most recently identified as an optimal indicator of proliferation of human endothelial cells. Therefore, in this chapter, we approach angiogenesis in gallbladder carcinoma, using as base a study that we did to determine the tumoral vascular density assessed through the immunohistochemical analysis of the expression of CD105 in 28 surgical specimens of gallbladder cancer by Chalkley count that has been suggested as a standard in a recent international consensus. We also researched the association of the intratumoral microvessel density with some prognostic factors for this neoplasia. In this study, there was no statistically significant association between microvessel density and TNM stage, histological levels, sex or age. However, we observed a high microvessel density in most cases. Therefore, the participation of the neovascularization seems to be a very important event in the tumoral development, but not related to the analyzed prognostic factors.

Tumor Angiogenesis in Gallbladder Cancer

INTRODUCTION

Gallbladder cancer is a relatively infrequent but highly lethal disease. This neoplasm is the most common malignant tumor of the biliar tract and the sixth among the neoplasms of the digestive tract [1,2], corresponding to approximately 1 to 3% of the cholecystectomy specimens performed for cholecystitis [3]. Because the symptoms are seldom suggestive of cancer and imaging techniques are usually non-diagnostic, gallbladder cancer is associated with late diagnosis and rarely diagnosed before surgical removal. Therefore, the prognosis of this tumor is poor, and in most series, presents a 5-year survival rate of at the most 5%, since less than 10% of the patients have a resectable tumor at the time of diagnosis, and mean survival is less than 6 months [1,4,5,6].

The incidence of the gallbladder carcinoma varies a lot in different parts of the world, being more frequent in some Latin America countries and India. In Chile this affliction is in third place as cause of death when compared to all neoplasias, being the second among the tumors of the digestive tract. In this country, it is the most frequent cause of death due to malignant disease among women, with a high incidence, around 13 cases for 100.000 inhabitants. In India it occurs in about 4,5 for 100 000 inhabitants in the male population, reaching levels of 10,1 for 100 000 inhabitants in women of the north of this country. High incidences are also held in Israel, Poland, Mexico and Bolivia[7,8].

In Brazil, the incidence of primary carcinoma of the gallbladder is of 0,8% in relation to other neoplasias. In Porto Alegre it is responsible for 3,09 deaths for 100.000 inhabitants [9,10]. This pattern has been modified universally in the last decades, with the demonstration of mortality rates for gallbladder cancer, inversely proportional to the rates of cholecistectomy [7].

Gallbladder neoplasia is a disease of poor current prognoses, mainly, as a consequence of late diagnosis, due to an unspecified clinical presentation, then the studies of this disease are addressed to the identification of risk factors or, at the other end, to the research of therapies

that might be used in advanced phases of the disease, since it is little responsive to the outlines of radiation or chemotherapy available. In view of this fact, the antiangiogenic therapy represents one of the promising modalities for the treatment of this and other neoplasia at present [11].

Angiogenesis is the necessary propelling force, not only for the tumorous growth, but also for the progression of pre-malignant cancer lesions, in the spreading of tumorous cells through the blood system and in the evolution of dormant micro-metastases into frankly metastatic lesions [12]. This concept, already well established, has been generating great interest in the potential clinical applicability for the inhibition of angiogenesis associated to malignant neoplasia. This way, the objective of this new therapeutic modality is to induce tumorous regression and to obstruct its metastatic spreading by blocking the supply of nutrients and oxygen to the neoplastic cells [13]. Besides, in the last years, an increment in research is being observed, to identify the prognostic significance of the intratumoral angiogenesis (assessed as microvessel density) in malignant tumors [14,15,16,17,18].

CD105 (endoglin) is a transmembrane glycoprotein that is predominantly expressed on the surface of the endothelial cells of both peri and intratumoral neoformed blood vessels. CD105 is an accessory component of the transforming growth factor- β receptor complex and is involved in vascular development and remodeling. Recent immunohistochemical studies have demonstrated that CD105 is present in the actively proliferative endothelium of the blood vessels of tumorous tissue and it plays an important role in the vascular neoformation. Besides, CD105 is largely expressed in small and likely immature tumor vessels (high proliferation index), as determined by immunohistochemical staining for CD105, as demonstrated in prostate [15] and breast tumors [13]. The evaluation of the intratumor microvessel density (MVD), determined by the use of anti-CD105 antibodies has demonstrated being an independent prognostic indicator for some malignant neoplasias, such as breast carcinoma [18]. These properties have made CD105 an important objective for the research of anti-angiogenic therapies [14,16]. As in the other neoplasias, it is to be supposed, that a similar angiogenic process is necessary for the

growth, invasion and metastatization of gallbladder carcinoma, however, little is known about the importance of the neovascularization in this tumor [2,7,17].

Studies of the assessment of angiogenesis have mainly been based on this “hot-spot” approach (vascular tumor areas on highest microvessel density), preferentially using the technique of counting microvessel profiles by all immunohistochemically stained distinct endothelial cell clusters in a microscopic field. However, different studies have used different techniques [19,20]. One of these methods is represented by applying a Chalkley grid with 25 points on the hot spots [21]. This technique, suggested as a standard in the international consensus [22] is considered to be a simple and acceptable procedure for daily clinical use [18].

Therefore, in this chapter, we will approach the angiogenesis in the gallbladder cancer, using as a basis a study that we performed, to determine the microvessel density appraised through immunohistochemical analysis of the expression of CD105 in surgical specimens of gallbladder cancer by Chalkley count [21], and their association with some prognostic factors for this neoplasia.

MATERIAL AND METHODS

Twenty-eight consecutive cases of gallbladder carcinoma were selected from the files of the Department of Pathology. The hospital records of these patients were reviewed to obtain the pertinent clinical information.

Starting from the paraffin blocks, new slides were made with H&E for confirmation of the histological diagnosis and selection of the best blocks in each case (with representative tumor mass) for the making of new slides. The sections made were deparaffinized in xylol and rehydrated with alcohol. Epitope retrieval for CD105 was performed by microwave heating in EDTA solution, in order to revert the effect of fixation in formalin. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersing the slides in the solution with H₂O₂ 0,3% and methanol for 30 min. Then the slides were washed twice with a phosphate-buffered solution (PBS) and, after that, bottled in a normal serum for blockage of unspecified connections (Protein Block Serum.

DAKO). Next the sections are covered with primary monoclonal antibody anti-CD105 (NCL-CD105, monoclonal, Novocastra Laboratories LTDA, UK) at a 1:40 with overnight incubation at 4°C. After another washing with PBS, the sections were incubated with secondary antibody for 40 min and then in a biotiny-peroxidase complex (Novocastra. Kit) for 40 min and then washed with PBS. The antigen-antibody connection was visualized with DAB (diamine benzidine-tetrachloride) and counter-stained with hematoxylin. As positive control we used sections of tonsil and as negative control, slides of this same organ using saline solution instead of primary antibody.

The evaluation of the microvessel density was made by Chalkley counting. Three areas of highest vascularization (“hot-spots”) were chosen subjectively from each tumor section at low power (x100). A 25-point Chalkley eyepiece graticule [21] at high power (x 250) was applied to each “hot-spot” area. The eyepiece graticule is oriented to permit the maximum number of points to hit on, or within the areas of immunohistochemically highlighted microvessel profiles [18,19,21,22]. The microvessel score was assigned the mean of the blood vessel counts obtained from the three chosen fields. All Chalkley counts were performed by one observer, similar to Hansen [18], which represents a modification of the procedure described by Fox et al [23]. Less than 5 min were necessary to examine each case (figure1).

The evaluation of the relationship between MVD and the prognosis of this neoplasm was performed using the prognostic factors validated by Henson [4] in 1992. We used the pTNM staging system (American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer 2004) to assess the stage of the disease, besides the study of grade and histological type of lesions. For purposes of statistical analysis we divided the gallbladder cancer cases into two categories: early (TNM stages I and II) and advanced (TNM stages III and IV), according to the criteria of Sato et al [24].

The statistical analysis used to assess the correlation between the clinico-pathological parameters and microvessel density was the ANOVA to histological levels and Student *t* test for the other parameters. The *p* value < 0,05 was used for statistical significance.

RESULTS

In the 28 cases studied, the mean age was 61,9 years, and 89.3% of the patients presented for diagnosis over the age of 50. Eighty two percent (23) of patients were female. There was no statistically significant difference in the MVD in the intratumoral average, in the different age groups appraised, as well as in relationship to gender.

All cases were adenocarcinomas. In relation to the histological grade, no statistically significant difference was observed.

Similarly, in the TNM staging system, there was no significance in the differences found in the early (stage I and II) and advanced disease (stage III and IV) as to the microvessel density, as in relation to the other clinico-pathological parameters, which can be observed in table 1.

The means of microvessel density observed in this sample was $9,5 \pm 2$.

CONCLUSION

Angiogenesis refers to the development of new vessels starting from the pre-existent vessels, a fundamental process not only for tumor growth but as well as for the spreading of tumor cells in the blood stream and in the growth of dormant metastases into frankly metastatic lesions [18]. The role of angiogenesis was described by Folkman [16], that first postulated it 1971, that solid tumors could stay dormant until a size of only 2 to 3mm³, in the absence of neovascularization, their size being limited by the diffusion of oxygen and nutrients. Subsequent revision, performed by this same author in 1990, showed clear evidence, both in experimental studies and in humans, that tumorous growth is “angiogenesis-dependent” [17]. The angiogenesis process involve multiple stages, sequential and interdependent, beginning with the degradation of the basal membrane that surrounds the capillaries, followed by the invasion of the circundant stromal towards the angiogenic stimuli. The migration of the endothelial cells

is accompanied by its proliferation and organization into three-dimensional structures, which link to other similar structures and form a net of new vessels.

Neoplastic cells can over-express structural angiogenic factors or respond to external incentives so that they are expressed. The main external stimuli for the expression of these factors is the hypoxia, which induces a cascade of signaling roads that will lead to the increase of the transcription of several angiogenic factors [15,19,22].

In the last decade, a dichotomy is observed in what refers to research of angiogenesis in cancer: on one side, the quantification of angiogenesis for use in the tumoral prognosis and, on the other side, the attempt to inhibit angiogenesis in order to halt the tumor growth. Nowadays, significant progress is observed in both directions, and several antiangiogenic agents have entered clinical trials and the potential role of antiangiogenic therapy has been revised in recent papers [11,15,16,22]. In this way, besides aiming at the inhibition of the activity of pro-angiogenic agents or the use of inhibiting agents of angiogenesis, another new aspect in research is the search for selective target in the endothelial cells of blood vessels associated to the tumor. Since the proliferation of the endothelial cells associated to the tumor neovascularization happens 20 to 2000 times quicker than that observed in the vascularization of the normal tissue [25], over-expressed molecules on endothelial cells with active proliferation, represent possible targets for anti-angiogenic therapy.

The expression of CD105 is mainly restricted to vascular endothelial cells on which high levels of this protein are detectable. CD105 is weakly expressed on hematopoietic progenitor cells, fibroblasts, stromal and macrophages and is absent or can be found in scarce amount in lymphatic endothelial cells of the human skin. In agreement with the notion that angiogenesis is regulated positively by the hypoxia and that CD105 is over-expressed in the neovascularization of angiogenic tissue, it was demonstrated that levels of activation of CD105 are regulated moderately by hypoxia, through factor hypoxia inductor (HIF-1) and that hypoxia conditions and TGF- β 1 cooperate to induce the expression of CD105 [13].

In malignant tumors CD105 expresses itself almost exclusively in the endothelial cells of the peri and intra-tumorous blood vessels and on tumor stromal components. Besides, small

and, probably, immature tumor vessels (high proliferation index) are stained mainly by monoclonal antibodies anti-CD105, as demonstrated in prostate tumors [15] and breast tumors[18]. Recent studies accomplished in animal models with breast and colon neoplasia, using the anti-CD105 anti-body conjugated with immuno-toxins and immuno-radioisotopes demonstrated an efficient suppression of the tumorous growth, without significant systemic side-effects [16].

CD105 is considered a powerful marker to quantify the density of intratumoral microvessels in solid and hematopoietic neoplasm including breast tumor, prostate, colorectal, lung tumor (non-small cell) and multiple mieloma [15,26,27]. An increase in MVD, as determined by CD105 immuno-staining, was found during the progressive of stages of colorectal carcinogenesis, suggesting that the level of neovascularization, using CD105 as marker, can represent a predictor of development of colorectal cancer [26]. Besides, the intratumoral microvessel density has proved to be an independent prognostic indicator for some malignant neoplasias, and an increased MVD correlates directly with a shorter survival in different solid tumors [14,16,28,29]. Targeting of CD105 for the treatment of solid tumors has been experimentally validated in mice. The radio-labeled or immuno-toxin-conjugated anti-CD105 demonstrated a high anti-tumor efficacy in severe combined immunodeficient mice, bearing human breast carcinomas, likely mediated by the inhibition of tumor-associated angiogenesis, and/or by destruction of tumor-associated vasculature [13].

Therefore, several studies have indeed found the correlation of intratumor microvessel density with angiogenic factor expression, tumor growth and occurrence of distant metastasis, suggesting that MVD, the well as quantifying the vascular morphology, contain important information on the degree and functionality of the tumor vasculature [30]. Most studies have employed the method based on the pioneering work of Weider et al [31]. These studies have shown that an increased microvessel density as a measure of angiogenesis is a powerful prognostic tool in many human tumor types. Nevertheless, probably due to differences and problems in methodology, not all investigators have been able to confirm that highly vascularized tumors are associated with a reduction in survival. The major considerations in

relation to variability in the quantification of the tumor angiogenesis in tissue sections are the choice of endothelial antibody, the selection of tumor area for assessment, the vascular parameter measured, methods of assessment and the cut off used in correlation analysis with other clinicopathological variables and survival.

The Chalkley count is the number of grid points that hit stained vessels, taken as the average from the assessment of three hot spots. Although intending to be a surrogate estimate of the microvessel density, it is actually a relative area estimate of immuno-stained vessels expressed by an index without unit. However, the area estimate may biologically represent an interesting parameter regarding tumor-to-blood exchange capacity or paracrine effect of the vessels. This technique was recommended in an international consensus report [22], and its methodological contribution in the variability inter-observational tends to be lower than that observed in the more frequently used microvessel density method.

Few studies were performed to evaluate the importance of angiogenesis in the gallbladder carcinoma [17,28,32]. Sugawara et al [32] using CD34 to evaluate the intratumorous microvessel density in the gallbladder carcinoma, did not observe association between the neovascularization and the tumor prognostic, suggesting that intratumor angiogenesis is of limited importance in cancer spread. However, CD34 is a pan-endothelial cell marker, therefore, it may not be able to reflect the exact angiogenesis activity in a tumor. According to some previous reports, CD105 is an endothelial marker that appears to react only with the endothelial cells in the newly formed vessels, and in particular, the immature tumor blood vessels [33]. Moreover, studies in other neoplasm have suggested that scores of intratumoral microvessel density by CD105 immunostaining might be superior to those of the score using CD34 in terms of prognostic information [27,33].

Kitamura et al [28] evaluated the angiogenesis in gallbladder cancer by CD105 immunostaining, however using other methods for quantifying tumor angiogenesis. Giatromanolaki et al [17] evaluated the microvessel density in gallbladder neoplasm using CD31 and observed that a high microvessel density defines a poorer prognosis even within the group of well differentiated carcinomas of the gallbladder. It is necessary to emphasize that, although CD31 has a lower

specificity for neofomed vessels than the CD105, recognizes most of the capillary and has obtained reliable microvessels immuno-staining in tissues fixed in formalin and soaked in paraffin. However, this author did not use Chalkley's method for the counting of these vessels. [19,34,35].

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated the intratumoral microvessel density by CD105 immunostaining using Chalkley counting in gallbladder cancer. Although we have not observed statistically significant differences when analyzing the average microvessel density in relation to the analyzed clinical-pathological parameters, it is good to emphasize that these values oscillated between 5 and 14, and that in breast carcinoma, in which the microvessel density (evaluated with the same technique that we used) and considered as an independent prognostic factor, the Chalkley count cutoff points at 5 and 7 [18]. In other words, if Chalkley index is below 5, the case is considered low microvessel density, between 5 and 7 intermediate, and above 7 high. Then, most of our cases would fall into intermediate or high indexes (figure 2), if we considered these cut points for gallbladder carcinoma.

We should still consider the possibility that we have not observed statistically significant differences in the microvessel density in the different stages of the disease and the current histological degree, due to the size of the analyzed sample. Besides, we do not have the complete survival rate data of this sample (and for that reason they were not analyzed). In our previous series of 60 cases of gallbladder carcinoma, we observed in relation to survival a median of 3,9 months. This fact, without doubt, turns difficult the analysis of this parameter. We did not use tercis for the analysis of MVD, because stratification in still smaller groups could cause loss of statistical power, however if we did it at the cut points, there would be between 8 and 10 (corresponding to 33% and 66% respectively).

This way, starting from the observation of our cases, in which most of them present an expressive vascular density, it remains to be seen if this fact is associated to a more aggressive behavior of this neoplasia and if the use of CD105 as a target for anti-angiogenic therapy will obtain a significant clinical result. Meanwhile, only studies with more significant samples (that

are under way in our service) associated the analysis of survival rates, can answer these questions. The important thing is that in the future research be used a methodology standardized by consensus, such as Chalkely's method, and that the choice of endothelial antibody be also standardized.

Table 1. Correlation of microvessel density with clinical-pathological aspects and prognostic factors in carcinoma of the gallbladder.

Parameter	No. of cases	MVD	value of p
Age			
< 50 years	2	9,67+ 2,82	0,918 *
>50 years	26	9,51+ 2,01	
Sex			
Female	23	9,42+2,13	0,568 *
Male	5	10,00+1,43	
Histological grade			
Well differentiated	3	10,67+2,91	0,139 *
Moderately differentiated	9	10,30+1,80	
Poorly differentiated	16	8,88+1,84	
pTNM stage			
I and II	7	8,81+2,44	0,288 *
III and IV	21	9,76+1,86	

* Non-significant **p** values

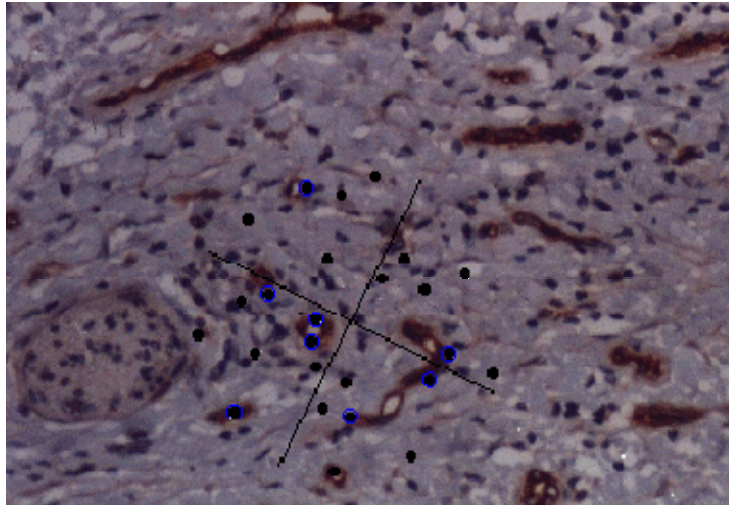


Figure 1. Example (illustrated) of Chalkley counts in hot-spot (X200). Hitting Chalkley dots are marked by blue circles. The Chalkley grid area is 0.196mm^2 .

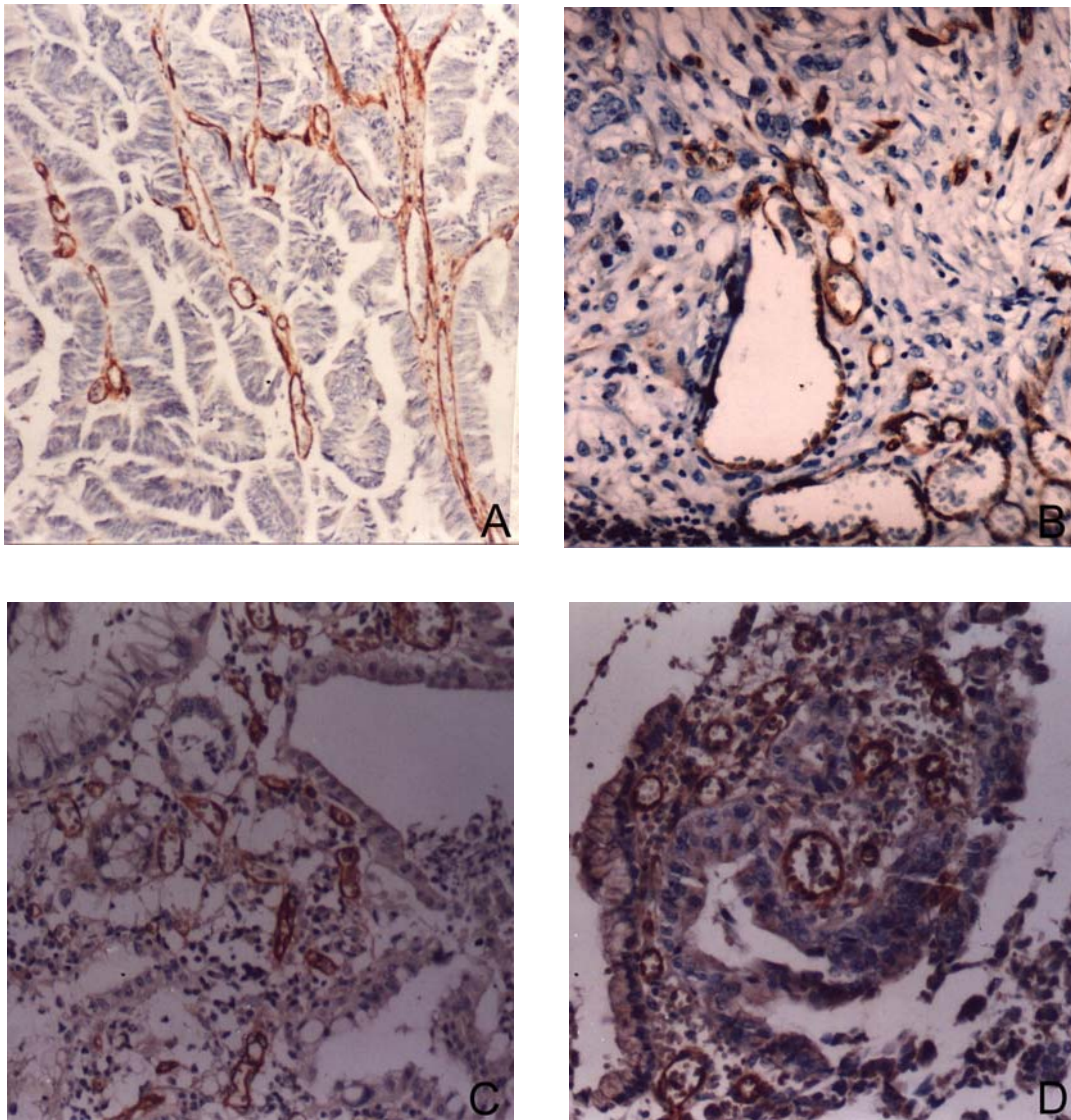


Figure 2. CD105 immune-reactivity in endothelial cells of angiogenic blood vessels showing high microvessel density. (A) Carcinoma of gallbladder well differentiated. (B) Carcinoma of gallbladder moderately differentiated. (C,D) Gallbladder cancer poorly differentiated.

REFERENCES

1. Wistuba II; Gazdar AF. Gallbladder Cancer: Lessons from a rare tumor. *Nat Ver Cancer* 2004; 4(9): 695-706.
2. Greenlee RT; Hilll Harmon MB; Murray T; et al. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51:15-36, 2001.4.Henson DE; Albores-Saavedra J; Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6):1493-1497.
3. Pandey M; Pathak AK; Amitabh G. Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6):1145-1151.
4. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
5. Tazuma S; Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3): 224-229.
6. da Rocha, AO; Coutinho LMB; Scholl JG; Leboutte LDP. The value of p53 protein expression in gallbladder carcinoma: Analysis of 60 cases. *Hepato-Gastroenterology* 2004; 51: 1810-1814.
7. Lazcano-Ponce EC; Miquel JF; Muñoz N; et al. Epidemology and molecular pathology of gallbladder cancer. *Cancer J Clin* 2001; 51: 349-364.
8. Kaushik SP. Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8): 848-854.1. Wistuba II; Gazdar AF. Gallbladder Cancer: Lessons from a rare tumor. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(9): 695-706.
9. Brumini R; Torloni H; Henson DE; Gotieb SLD; Souza JMP. Câncer no Brasil - Dados Histopatológicos - 1976—1980. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982.
10. Atlas de mortalidade por cancer: *Inca* 1995-1999. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2000.
11. Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concepts to therapeutic trial. *Cancer Control* 1999; 6(5): 436-458.
12. Poon RT-P; Fan S-T and Wong J. Clinical Implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4): 1207-1225.

13. Fonsatti E; Altomonte M; Nicotra MR; et al. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessel. *Oncogene* 2003; 22: 6557-6563.
14. Duff SE; Li C; Garland JM; et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potencial applications. *FASEB J* 2003; 17: 984-992.
15. Wikstrom P; Lissbrant IF; Sattin P; et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature bold vessels and is marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51: 268-275.
16. Fonsatti E; Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2(1):18.
17. Giatromanolaki A; Sivridis E; Koukourakis MI; et al. Prognostic role of angiogenesis in operable carcinoma of the gallbladder. *Am J Clin Oncol* 2002; 25(1): 38-41.
18. Hansen S; Grabau DA; Sorensen FB; et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkely counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:139-146.
19. Fox SB; Harris AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Investigational New Drugs* 1997; 15: 15-28.
20. Fox SB; Harris AL. Histological quantification of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004; 112 (7-8): 413-430.
21. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of Tissues. *J Nat Cancer Inst* 1943; 4: 47-53.
22. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
23. Fox SB; Leek RD; Weeks MP; et al. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177: 275-283.
24. Sato T; Koyama K; Yamaguchi H; et al: Early carcinoma of gallbladder. *Gastroenterol Jpn* 1981;16: 459-464.
25. Herlyn M. Endothelial cells as targets for tumor therapy. *J Immunother* 1999; 22: 185.

26. Akagi K; Ikeda Y; Sumiyoshi Y; et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131(1): 109-113.
27. Tanaka F; Otake Y; Yanagihara K; et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer res* 2001; 7: 3410-3415.
28. Kitamura K; Kasuya K; Tsuchida A; et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta in gallbladder cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 327-332.
29. Hlatky L; Hahnfedt P; Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-893.
30. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Quantification of angiogenesis in solid tumours: an international consensus on the methodology and criteria evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 14: 2474-2484.
31. Weidner N; Semple JP; Welch WR; et al. Tumor angiogenesis: and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl j Med* 1991; 324:1-8.
32. Sugawara Y; Makuuchi M; Harihara Y; et al. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 1999; 46: 1682-86
33. Ho J W; Poon RT; Sun CK; et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11(2): 176-181.
34. Horak ER; Leek R; Klent N; et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340:1120-1124.
35. Parumus D; Cordell J; Micklem K; et al. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-757.

ARTIGO 2- INGLÊS

Title: The Prognostic Value of Angiogenesis by Chalkley Counting in Gallbladder Carcinoma

Authors: Andréa Oxley da Rocha

Lígia Maria Barbosa Coutinho

João Grigoletti Scholl

Institution: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre - Programa de Pós-graduação em Patologia

Key Words: gallbladder neoplasm, CD105, angiogenesis

ABSTRACT

OBJECTIVE: tumor angiogenesis has been proposed as essential to tumor growth, proliferation and, eventually, metastases and, although for several malignant solid tumors a high microvascular density is associated to a bad prognosis, for gallbladder neoplasia, these data remain obscure. Therefore, we performed this study with the objective of evaluating the prognostic value of angiogenesis measured through the Chalkley counting method, using CD105 as an endothelial marker, in surgical specimens of gallbladder carcinoma.

MATERIAL AND METHODS: Thirty cases of gallbladder carcinoma were studied by immunohistochemical technique with antibody anti-CD105 for the identification of neoformed intratumoral vessels. The intratumoral microvessel density was evaluated through the use of the Chalkley counting method, and researched the association of this index with the survival rate and the prognosis factors validated for this neoplasm.

RESULTS: We obtained, starting from the analysis of our data, a cut off in the tumor vascular density at 8,5, considering the cases above this value as of high vascular density. We observed an association between high intratumoral microvessel density and survival rate lower to 6 months ($p < 0,026$). We did not observe an association between vascular density and the other prognostic factors evaluated.

CONCLUSION: The present study confirms the hypothesis that a high vascular density, appraised through the Chalkley counting method is associated to a worse prognosis in the bearers of gallbladder carcinoma, however studies with larger samples are necessary for the confirmation of these data.

INTRODUCTION

Angiogenesis consists in the formation of new capillaries, starting from the pre-existent vasculature. This is a fundamental process for the tumorous growth and was described by Folkman¹, who first postulated it in 1971, that solid tumors could remain dormant until a size of only 2 to 3mm³, in the absence of neovascularization, its size being limited by the diffusion of oxygen and nutrients from the circumjacent tissues².

Differently from what happens in physiologic conditions, the delicate balance of the modulation between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors is altered in the "tumorous environment", which affects the function of several cellular types and can induce abnormal vascular growth. Therefore, the proliferation of the endothelial cells, associated to the tumorous neovasculature happens 20 to 2000 times quicker than that observed in the vasculature of normal tissue³. This process of vascular neoformation is necessary not only for tumorous growth, but it is also involved in the initial progression of pre-malignant lesions into cancer, in the spread of tumorous cells in the blood circulation and in the growth of dormant micrometastases into frankly metastatic lesions⁴.

Although it is recognized that neoplastic tissue is more densely vascularized than normal tissue, only after Folkman's hypothesis¹ on antiangiogenesis, it was that quantitative methods to measure angiogenesis in tissue slides, were proposed. The cloned origin of angiogenic activity, being heterogeneously distributed inside the tumor, has been used as an argument to quantify angiogenesis in areas of more intense neovascularization denominated "hot-spots". In this way, the evaluation studies of tumorous vascular density have been based, mainly, on the use of these "hot-spots", using a microvessel counting technique through the use of specific immunohistochemical stained for endothelial cells or groups of cells under the microscope. However, different studies, have used different techniques. One of these methods uses Chalkley's grid with 25 points projected on the "hot-spot". This technique, suggested as a pattern in an International Consensus⁵, is considered fast and easily reproducible.

Many studies have defined the role of CD105 as a powerful marker to quantify the microvessel density in solid and hematopoietic tumors, including breast cancer⁶, prostate cancer⁷, colorectal cancer⁸ and lung cancer⁹ (not of small cells).

CD105 (endoglin) is an expressed glycoprotein on the cellular surface (membrane) being a component of the receiving compound TGF- β (Transforming Growth Factor). TGF- β is one of the growth factors that regulates several cellular functions including the proliferation, differentiation, migration, synthesis of the extracellular matrix, being particularly involved in angiogenesis¹⁰. This glycoprotein expresses itself, almost exclusively, in the endothelial cells of the peripheral and intratumoral^{11,12,13} blood vessels. Besides, small, and probably immature tumorous vessels (with high proliferation index), are stained mainly by monoclonal antibodies anti-CD105, as demonstrated in prostate and breast tumors.

The density of intratumoral microvessels, determined by using anti-CD105 antibodies has demonstrated to be an independent prognostic indicator for some malignant neoplasias, and an increased microvascular intratumoral density if it correlates directly with shorter life-expectancy^{11,14,15}. However, possibly due to the employment of different techniques and methodology problems, several researchers have not been successful in confirming the hypothesis that densely vascularized tumors are associated to the reduction of survival rate¹⁶. In the gallbladder neoplasm this fact is not established. Besides, few studies were carried out to evaluate the importance of angiogenesis in the gallbladder^{14,17,18,19,20,21} carcinoma, with divergent results.

In this way, we carried out this study with the objective of evaluating the prognostic value of angiogenesis measured through Chalkley's method, using CD105 as endothelial marker, in surgical specimens of gallbladder carcinoma.

MATERIAL AND METHODS

Thirty cases of gallbladder carcinoma were selected from the archives of the Pathology Department of the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. The source of all specimens was surgical resection of the gallbladder or tumor biopsy. The hospital records of these patients were revised in order to obtain the pertinent clinical data.

The evaluation of the association between the tumorous vascular density and the prognostic of this neoplasia was accomplished using the validated prognostic factors Henson²² in 1992. The pathological classification TNM (*American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer 2004*) for the evaluation of the stage of the disease, beyond the study of the degree and histological type of the lesions. For purposes of statistical analysis we divided the cases of gallbladder cancer into two categories: early (pTNM I and II) and advanced (pTNM III, IV) in agreement with the criteria of Sato et al²³. Dates on the survival was obtained of the General Office of Health of State.

Imunohistochemical Technique

Starting from the blocks of paraffin new sections were made to confirm the histological diagnosis and to select the most representative block of each case. The sections were submitted to the removal of paraffin in xylol and rehydrated with ethanol and water. A preliminary treatment, for antigenic recovery was applied by heating the slides in a microwave in EDTA, reverting the effect of the fixation in formol. The activity of the endogenous peroxidase was blocked by immersion of the sections in a solution with H₂O₂ 0,3% and methanol for 30 min. After that, the slides were washed with PBS to 40°C and afterwards in normal serum (Protein Block Serum. DAKO). The primary antibody used was the monoclonal anti-CD105 (NCL-CD105, monoclonal, Novocastra Laboratories LTDA, UK staying overnight at 4°C. After a new wash with PBS, the slides were covered with a secondary antibody for 30 min. and, after that, in a compound of biotin-peroxidase (Novocastra Kit) for 40 min. and then, washed with PBS. The antigen-antibody connection was visualized with DAB (diamino benzidine-tetrachloride) and again counter-stained with hematoxilin. We used as positive control tonsil cuts and negative

plaques of this same tissue, the primary antibody being substituted by saline solution. We considered as positive only those cases in which there were unequivocal homogeneous stain of the cytoplasm and membrane of the endothelial cells in brown.

Quantification of the microvessels

The evaluation of the vascular density was accomplished using Chalkley's counting method. Three areas of high vascularization ("hot-spot") were chosen in each sheet examined in lower magnifying (100X). In higher magnifying (200X) Chalkley's graticule with 25 points was applied for each "hot-spot" and guided to allow the maximum of coincident points with the vascular structure immunohistochemically stained. Any endothelial stained cell, whether isolated or forming groups of cells, clearly separate from adjacent vessels, tumorous cells or other connective tissue was considered a microvessel^{21,24,25,26}. The final index was obtained by calculating the average among the three counted fields, for each case (figure 1).

Statistical analysis

To define the cut off in vascular density, an analysis of the dispersion diagram drawn between the survival rate and the vascular density (Chalkley's score) establishing the cut off in 6 months (figure 2). The ROC curve was followed to verify the cut off of the vascular density according to the sensitivity and specificity, obtaining a cut with an 8,5 value. The association among the other variables was done using Fisher's exact test. The cases were grouped into two categories according to the vascular density: high, when this index was equal or higher than 8,5 or low microvessel density intratumoral, when the value was below 8,5.

The anallysis of survival was performes using the Kaplan-Meier curve (figure 3).

RESULTS

In the 30 cases studied the mean age was 62 years of age, being that 86,2% of the patients turned up with more than 50 years of age to the diagnosis. Eighty three percent (25) of the patients were female. No association between microvascular density and these parameters was observed.

Eighty percent of the patients were diagnosed in advanced phases of the disease (stages III and IV). All the results of prognosis features evaluated can be observed in Table 1.

We did not observe a statistical significance in the differences found in the analysis of the different prognosis factors and the intratumoral microvessel density. However, the analysis of the intratumoral vascular density showed an association with high density (index >8,5) with a survival rate lower than 6 months (p0,026) (Table 2)

Sixty five percent of the patients (18) had a survival rate lower than 6 months, with a mean time 7,18 (standard error 1,09) months and median of 4,83 months (figure 3)

DISCUSSION

Although for several human malignant neoplasies, such as breast²⁷ carcinoma, lung²⁸ and colorectal²⁹, a high intratumoral angiogenesis has been associated to a bad prognosis, for the tumors of the biliar tract, this aspect is still little explored.

Sugawara et al.¹⁸, evaluated the intratumoral microvessel density in 40 cases of gallbladder carcinoma, using CD34 as endothelial marker but they did not observe any association between the neovascularization and the tumor's prognosis, suggesting that angiogenesis presents limited importance in the spread and growth of this neoplasia. Other researchers, however, tell about an association between other angiogenic factors and gallbladder carcinoma. In this way, Okita et al.²⁰ found an association between the expression of VEGF and the tumorous progression in this neoplasia. Hida et al.³⁰ found an association between the VEGF expression and a bad prognosis in extra-hepatic carcinoma. Gohongi et al.¹⁷ also observed an expression of TGF- β 1 in the tumorous cells of the epithelium in a few cases of gallbladder carcinoma, independent of the appraised histological type.

The value of angiogenesis to predict the prognosis of 48 patients, bearers of gallbladder carcinoma stages I to III, submitted to simple colecistectomy, were studied by Giatromanolaki et al.²¹, using the endothelial marker CD31. These authors observed that a high vascular density defined a bad prognosis even in bearers of well differentiated carcinomas and proposed, that

the intratumoral microvessel density be considered an independent prognosis factor for this neoplasia.

Kitamura et al.²² in 2003, studied the expression of TGF- β in 45 cases of gallbladder carcinoma, looking for an association with angiogenesis (CD-34 and CD105). The expression of TGF- β was observed in 25 cases, being there association between the expression of TGF- β and the increase of the tumorous vascular proliferation (CD105). This association was not observed with CD34. Kalekou and Miliaras³¹, observed an association between the progressive increase of the tumorous vascular density and the increase of the depth of tumoral invasion on the wall of the gallbladder, when studying 33 cases of carcinoma of this organ, using factor VIIIaG. They concluded, starting from their results, that microvessel density is involved in the evolution of gallbladder carcinoma. A totally different result was described by Giatromanolaki et al²¹. These results should be appraised cautiously, since the choice of the primary antibody influences directly on the number of appraised vessels, depending on the specificity of the antibody for endothelial cells of neoformed vessels (they present a high proliferation index). The VIIIaG factor just identifies a proportion of the vascular endothelium, besides identifying lymphatic endothelial tissue³². Studies of different neoplasies have suggested that scores of intratumoral vascular density, using immunohistochemistry with CD105, can be better (higher specificity) than those scores obtained using CD34 and CD31 (pan-endothelial marker), in terms of prognosis information^{9,32}.

Therefore, few studies evaluated vascular density in gallbladder carcinoma through the counting of vessels in the "hot-spot"^{14,18,21,31}, using primary antibodies with a variable degree of specificity for neoformed vessels. The number of selected "hot-spots" varied in the described studies, as well as the selected primary antibody, the microscopic magnification used for gauging the data, and mainly, the definition of which structure was counted. This great variability in the used methodology, is certainly reflected in the disagreement of the results and conclusions observed.

In our study, we used the Chalkley counting that consists of the number of grid points that hit with stained vessels, obtained starting from the average of counted microvessels in

three “hot-spots”. Although it intends to be a surrogate estimate of the microvessel density intratumoral, it is actually a area estimate of immuno stained vessels, represented by an index, without unit. Meanwhile, the area deemed (“hot-spot”) can represent an important parameter regarding the capacity of the tumor in modifying its blood supply or the paracrine effect on the vessels. These areas of higher intratumor vascular density seem to be areas biologically important, possibly, because of the presence clones of tumorous cells with high angiogenic potential and, consequently, larger dissemination probability²⁶.

Chalkley’s counting technique was recommended by an International Consensus⁵, and there are well delineated reports, of its easy reproducibility²⁴, that demonstrate that the inter-observational variability tends to be lower than in other used methods.

Using an antibody with more specificity for the neoformed vessels, identified by adequate immunohistochemical technique, the method suggest as standard in an concensus⁵, we can observe that tumors with a high vascular density, that is to say, an index $\geq 8,5$, where associated in 84,6% of cases to a survival rate of less than 6 months. The cut off of intratumoral microvessel density, defined for this study, was determined starting from the survival analysis of the sample itself, observing the distribution of these patients in a dispersion diagram (figure 2) between the survival rate and the microvessel density values. In this analysis, it can be observed that when the index was above or equal to 8,5, almost the totality of patients survived less than 6 months. And analyzing these cases, no association was observed between histological type, degree of differentiation or pTNM staging system. This suggests that, even in well differentiated tumors that show a high vascular density, will probably show a worse prognosis, similar to Giatromanolaki’s²¹.

According to our knowledge, this is the first study which evaluates the intratumoral microvessels density, using CD105 by Chalkley counting in cases of the gallbladder cancer. The present study confirms the hypothesis that an increased tumorous density is associated to a lower survival rate. At the cutting point defined in our sample, there is a clear modification in the time of the patient's survival. The survival was shorter than 6 months when the Chalkley index of was higher or equal to 8,5 (high microvessel density) with a specificity of 91,4%.

Therefore, we believe that, similarly to what has been observed for other neoplasias^{8,11,24}, a high microvessel density is associated to a worse prognosis, for the bearers of gallbladder carcinoma.

What is expected is that one methodology be established as standard, such as Chalkey's method and, that the selection of the most specific antibody be also defined. These are fundamental conditions to be put in practice in future research, not only so that the prognosis of malignant neoplasias can be established with more safety but also for the development of antiangiogenic therapies^{11,13,15,22}, dependent on the identification of a specific target for endothelial cells of intratumor vessels

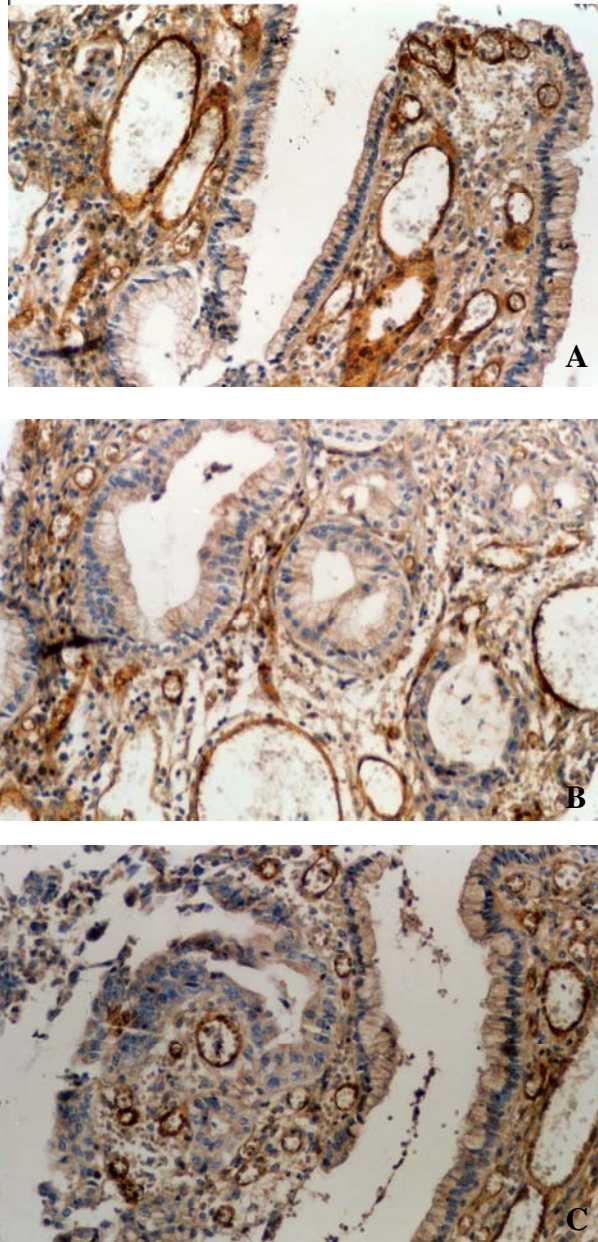


Figure 1. (A,B,C) Three selected hot-spot in high microvessel density areas in adenocarcinoma of the gallbladder (100X).

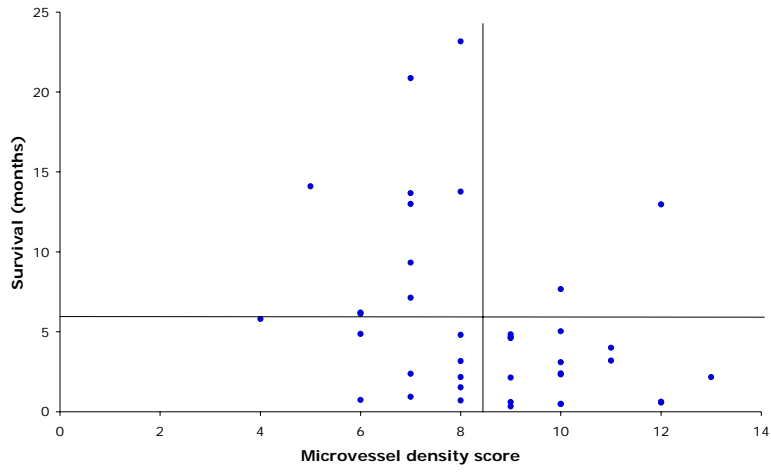


Figure2. Dispersion curve of survival and microvessel density

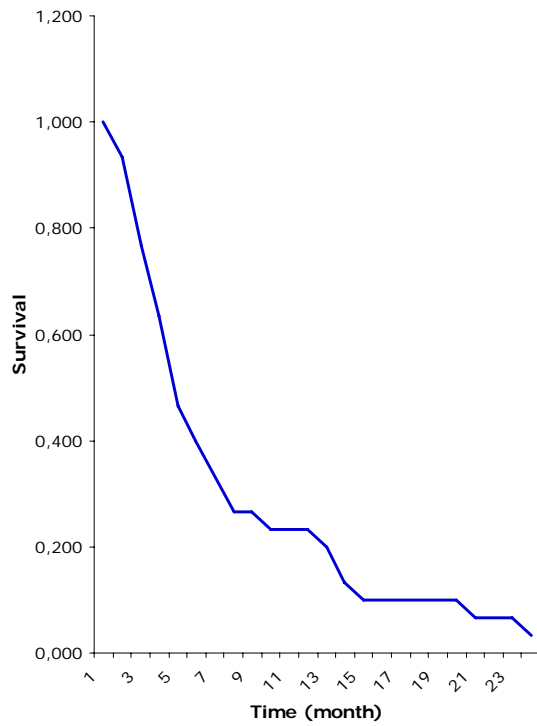


Figure 3. Survival curve of patients with gallbladder carcinoma

Table 1. Association of prognostic factors , survival and microvessel density (MVD) in gallbladder cancer

Prognostic factor	N°. cases	survival below 6 months	MVD high (>8,5)
Histológico type			
Adenocarcinoma	24	13 (54,1%)	12(50,0%)*
Adenoescamoso	6	5 (83,3%)	1 (16,7%)*
Histológico grade[†]			
Well differentiated	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)*
Moderately differentiated	15	6 (53,6%)	6 (40,0%)*
Poorly diferenciado	6	5 (83,3%)	5 (83,3%)*
TNM stage			
I and II	6	2 (33,3%)	1 (16,7%)*
III and IV	24	16 (67,7%)	12 (50,0%)*

*Non-significat p value † referring to the 24 cases of adenocarcinoma

Table 2. Association of intartumoral microvessel density (MVD) and survival

MVD	Survival	
	below 6 months	above 6 months
<8,5	7 (41,2%)	10 (58,8%)
≥8,5	11 (84,6%)*	2 (15,4%)*

*p0,026

REFERENCES

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 82-86.
2. Folkman J. Whats is the evidence that the tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
3. Herlyn M. Endothelial cells as targets for tumor therapy. *J Immunother* 1999; 22: 185
4. Poon RT-P, Fan S-T and Wong J. Clinical Implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4): 1207-25.
5. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
6. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2[?]tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Human Pathol* 2004; 35:176-183
7. Wikstrom P, Lissbrant IF, Sattin P, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature bold vessels and is marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51: 268-75.
8. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131(1): 109-113.
9. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis. *Lung Cancer* 2003; 39: 289-96.
10. Blobe GC, Schiellmann WP , Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342(18): 1350-58.
11. Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potencial applications. *FASEB J* 2003; 17: 984-92.
12. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, et al. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessel. *Oncogene* 2003; 22: 6557-63.

13. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2(1):18.
14. Kitamura K, Kasuya K, Tsuchida A, et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta in gallbladder cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 327-32.
15. Hlatky L, Hahnfedt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-893.
16. Reiss M. TGF- β and Cancer. *Microbes Infect* 1999; 1: 1327-47.
17. Gohongi T, Boucher Y, Yun CO, et al. Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor β 1. *Nat Med* 1999; 5: 1203-8.
18. Sugawara Y, Makuuchi M, Harihara Y, et al. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1682-86.
19. Tian Y, Ding Ry, Zhi YH, et al. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for determination of tumor vasclarity. *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 415-419.
20. Okita S, Kondoh s, Shiraishi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor progression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 1998; 12: 1013-1018.
21. Giatromanolaki A; Sivridis E; Koukourakis MI; et al. Prognostic role of angiogenesis in operable carcinoma of the gallbladder. *Am J Clin Oncol* 2002; 25(1): 38-41.
22. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
23. Sato T; Koyama K; Yamaguchi H; et al: Early carcinoma of gallbladder. *Gastroenterol Jpn* 1981;16: 459-464
24. Hansen S; Grabau DA; Sorensen FB; et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkely counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:139-146.
25. Fox SB; Harris AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Investigational New Drugs* 1997; 15: 15-28.

26. Fox SB; Harris AL. Histological quantification of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004; 112 (7-8): 413-430.
27. Horak ER, LeeK R, Klenk N, et al. Angiogenesis assessed by paltelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
28. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Angiogenesis is a significant prognostic marker in operable non small cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 86: 1421-1430.
29. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, et al. Combined role of angiogenesis, bcl-2 and p53 expression in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1999; 86: 1421-1430.
30. Hida Y, Morita T, Fujita M, et al. Vascular endothelial growth factor expression is na independent negative predictor in extrahepatic biliary tract carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 2257-2260.
31. Kalekou H and Miliaras D. Immunohistochemical study of microvessel density, CD44 (standar form), p53 protein and c-erbB2 in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(7): 812-818.
32. Ho J W, Poon RT, Sun CK, et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *Worl J Gastroenterol* 2005; 11(2): 176-181.

ARTIGO 1- PORTUGUÊS

ANIGIOGÊNESE TUMORAL NO CARCINOMA DE VESÍCULA

Autores: Andréa Oxley da Rocha

Mestre em Medicina UFRGS

Lígia Maria Barbosa Coutinho

Professora de Patologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brasil

João Grigoletti Scholl

Professor de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de
Porto Alegre, Brasil

RESUMO

A neovascularização do tecido tumoral tem sido proposta como essencial para o crescimento, proliferação e, eventualmente, metastatização do tumor. Embora a contagem de microvasos neoformados intratumoral, em muitas neoplasias malignas humanas tenha sido associada com o prognóstico, pouco se sabe sobre sua importância no carcinoma de vesícula biliar. Além disso, anticorpos específicos, direcionados à vasculatura tumoral são uma das mais promissoras modalidades terapêuticas nas neoplasias humanas, embora um marcador específico para as células da membrana endotelial da vasculatura tumoral ainda não tenha sido identificado. A endogлина (CD105) é uma glicoproteína expressa na superfície celular, recentemente identificada como um ótimo indicador da proliferação de células endoteliais em humanos. Assim, neste capítulo, será abordado a angiogênese no carcinoma de vesícula, usando como base um estudo que foi realizado para determinar a densidade vascular tumoral, avaliada através da análise imuno-histoquímica da expressão do CD105, em 28 espécimes cirúrgicos de câncer de vesícula, pelo método de Chalkley, que tem sido proposto como padrão em recente consenso internacional. Também será pesquisada a associação entre densidade de microvasos intratumoral e alguns fatores prognósticos para essa neoplasia. Não foram observadas associações estatisticamente significantes entre a densidade de microvasos intratumoral e estadiamento TNM, grau histológico, sexo ou idade. Entretanto, foi observada alta densidade microvascular intratumoral na maioria dos casos. Desta forma, a participação da neoangiogênese parece ser um importante evento no desenvolvimento tumoral, mas não relacionados aos fatores prognósticos analisados.

INTRODUÇÃO

O câncer de vesícula é uma doença pouco frequente, mas altamente letal. Esta neoplasia é o tumor maligno mais comum do trato biliar e a sexta entre as neoplasias do trato digestivo [1,2], correspondendo a aproximadamente 1 a 3% dos espécimes de colecistectomias realizadas por colecistite [3]. Como os sintomas são raramente sugestivos de câncer e as técnicas de imagem, habitualmente, não fazem o diagnóstico, o câncer de vesícula é associado com diagnóstico tardio e raramente diagnosticado antes da remoção cirúrgica. Assim, o prognóstico deste tumor é pobre, e em muitas séries, apresenta sobrevida em cinco anos de até 5%, uma vez que menos que 10% dos pacientes se apresentam com tumor ressecável no momento do diagnóstico, sendo que a média de sobrevida inferior a 6 meses [1,4,5,6].

A incidência do cancer de vesícula varia amplamente nas diferentes partes do mundo, sendo mais frequente em alguns países da América Latina e Índia. No Chile, esta afecção ocupa o terceiro lugar como causa de morte quando comparada às demais neoplasias, sendo a segunda entre os tumores do trato digestivo. Neste país, é a causa mais frequente de morte por neoplasia entre as mulheres, com uma incidência de aproximadamente 13 casos por 100.000 habitantes. Na Índia incide em cerca de 4,5 por 100.000 habitantes, na população masculina, atingindo níveis de 10,1 entre as mulheres do norte deste país. Altas incidências também são relatadas em Israel, Polônia, México e Bolívia [7,8].

No Brasil, a incidência do carcinoma primário de vesícula biliar é de 0,8% em relação as demais neoplasias. Em, Porto Alegre é responsável por 3,09 óbitos por 100.000 habitantes [9,10]. Este padrão tem se modificado universalmente nas últimas décadas, com a demonstração de taxas de mortalidade por câncer de vesícula inversamente proporcionais às taxas de colecistectomia [7].

Sendo a neoplasia de vesícula biliar uma doença de mal prognóstico decorrente, principalmente, do diagnóstico tardio, conseqüente a um quadro clínico inespecífico, estudos desta afecção direcionam-se para a identificação de fatores de risco ou, no outro extremo, à busca de terapias que possam ser usadas em fases avançadas da doença, já que esta é pouco

responsiva aos esquemas de radio e quimioterapia disponíveis. Em vista deste fato, a terapia antiangiogênica representa uma das mais promissoras modalidades para o tratamento desta e outras neoplasias na atualidade [11].

A angiogênese é a força propulsora necessária não só para o crescimento tumoral, mas também para a progressão de lesões pré-malignas para o câncer, na disseminação de células tumorais para a circulação sanguínea e na evolução de micrometástases dormentes para lesões francamente metastáticas [12]. Este conceito, já bem estabelecido, tem gerado grande interesse na potencial aplicabilidade clínica da inibição da angiogênese associada a neoplasia maligna. Desta forma, o objetivo desta nova modalidade terapêutica é induzir a regressão tumoral e impedir sua disseminação metastática por bloqueio do fornecimento de nutrientes e oxigênio as células neoplásicas [13]. Além disso, nos últimos anos, observa-se um incremento nas pesquisas para identificar a significância prognóstica da angiogênese (avaliada através densidade vascular) em tumores malignos [14,15,16,17,18].

O CD105 (endoglin) é uma glicoproteína expressa, predominantemente, na superfície das células endoteliais de vasos sanguíneos neoformados peri e intratumorais, que funciona como parte do complexo receptor do Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF- β) que está envolvido no desenvolvimento e remodelamento vascular. Estudos imuno-histoquímicos recentes têm demonstrado que o CD105 está presente no endotélio ativamente proliferativo dos vasos sanguíneos de tecidos tumorais e desempenha papel importante na neoformação vascular. Além disso, pequenos e, provavelmente, vasos tumorais imaturos (alto índice de proliferação) são principalmente corados por anticorpos monoclonais anti-CD105, como demonstrado em tumores de próstata [15] e mama [13]. A avaliação da densidade de microvasos intratumoral, determinada usando anticorpos anti-CD105, tem demonstrado ser um indicador prognóstico independente para algumas neoplasias malignas, como o carcinoma de mama [18]. Estas propriedades têm feito do CD105 um importante alvo para pesquisas de terapias antiangiogênicas [14,16].

Como nas demais neoplasias, é de se supor, que um processo angiogênico similar seja necessário para o crescimento, invasão e metastatização do carcinoma de vesícula biliar, entretanto, pouco se sabe sobre a importância da neovascularização neste tumor [2,7,17].

Estudos de quantificação da angiogênese têm sido baseados, principalmente, na técnica de “hot-spot” (áreas de alta densidade vascular), preferencialmente, usando a técnica de contagem de microvasos corados imuno-histoquimicamente, que identifica grupos de células endoteliais em um campo microscópico. Entretanto, diferentes estudos têm usado diferentes técnicas [10,20]. Um destes métodos é representado pela utilização da gráticula de Chalkley com 25 pontos [21]. Esta técnica, sugerida como padrão por consenso internacional [22], é considerada um procedimento simples para uso na prática clínica[18].

Assim, neste capítulo abordaremos a angiogênese no carcinoma de vesícula biliar, usando como base um estudo que realizamos para determinar a densidade vascular intratumoral, avaliada através da análise imuno-histoquímica da expressão do CD105, em espécimes cirúrgicas de câncer de vesícula, pela contagem de Chalkley [21], e sua associação com alguns fatores prognósticos para esta neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e oito casos consecutivos de carcinoma de vesícula biliar foram selecionados dos arquivos do Departamento de Patologia, a partir dos laudos anátomo-patológicos. Os prontuários hospitalares destes pacientes foram revisadas para obtenção dos dados clínicos pertinentes.

A partir dos blocos de parafina foram realizadas novas lâminas com H&E para confirmação do diagnóstico histológico e seleção dos melhores blocos de cada caso (com massa tumoral representativa) para confecção de novas lâminas. As lâminas foram desparafinizadas em xilol e re-hidratadas com álcool. A recuperação antigênica para o CD105 foi realizada por aquecimento das lâminas em microondas, em solução de EDTA, para reverter o efeito da fixação da formalina. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão das lâminas em solução com H₂O₂ 0,3% e metanol, por 30 min. Após, as lâminas

foram lavadas por duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) e, então, encubadas em solução de proteína para bloqueio das ligações inespecíficas (Protein Block Serum – DAKO). A seguir os cortes foram cobertos com anticorpo monoclonal primário anti-CD105 (NCL-CD105, monoclonal, Novocastra Laboratories LTDA, UK) 1:40 permanecendo à noite a 4°C. Após outra lavagem com PBS os cortes foram encubados com anticorpo secundário por 40 minutos e então, em complexo biotina-peroxidase (Novocastra – Kit) por 40 min e lavados com PBS. A reação antígeno-anticorpo foi visualizada com DAB (diamine benzidine-tetrachloride) e contra-corada com hematoxilina. Como controle positivo usamos cortes de amígdala e como controle negativo, lâminas do mesmo órgão, utilizando solução salina ao invés do anticorpo primário.

A avaliação da densidade vascular foi realizada pelo método de contagem de Chalkley. Três campos de alta densidade vascular (“hot-spots”) foram escolhidos subjetivamente em cada lâmina de tumor em menor aumento (x100). A lente graticulada de Chalkley com 25 pontos [21], em maior aumento (x 200), foi aplicada para cada área “hot-spot”. A lente graticulada é orientada para permitir o número máximo de pontos coincidentes sobre ou dentro das áreas com microvasos corados imuno-histoquimicamente [18,19,21,22]. O índice de microvasos foi obtido a partir da média da contagem dos vasos sangüíneos em três campos. Toda a contagem de Chalkley foi realizada por um observador, similarmente Hansen[18], que representa uma modificação do procedimento descrito por Fox et al [23]. Menos de 5 min foram necessários para examinar cada caso (figura 1).

A avaliação da associação entre DMV e o prognóstico desta neoplasia foi obtido utilizando os fatores prognósticos validados por Henson [4] em 1992. Utilizamos o sistema de estadiamento pTNM (*American Joint Committee on Cancer/ International Union Against Cancer 2004*) para avaliar o estágio da doença, além do estudo do grau e do tipo histológico das lesões. Para fins de análise estatística, dividimos os casos de câncer de vesícula em duas categorias: precoce (estádios pTNM I and II) e avançado (pTNM stages III and IV), de acordo com os critérios propostos por Sato et al [24].

A análise estatística usada para avaliar a associação entre os parâmetros clínico-patológicos e a densidade microvascular foi a ANOVA e Teste t de Student para os demais parâmetros. Um valor de $p < 0,05$ foi usado para significância estatística

RESULTADOS

Nos 28 casos estudados, a média de idade foi 61,9 anos e, 89.3% dos pacientes apresentavam, no momento do diagnóstico, idade superior à 50 anos. Oitenta e dois por cento dos pacientes (23) eram do sexo feminino. Não houve diferença estatisticamente significativa na densidade microvascular intratumoral média, nas diferentes faixas etárias avaliadas, bem como em relação ao sexo.

Todos os casos eram adenocarcinomas. Em relação ao grau histológico não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Similarmente, no sistema de estadiamento pTNM, não houve significância nas diferenças encontradas nas fases precoces (estádio I e II) e avançadas da doença (estádio III e IV) em relação a densidade microvascular, bem como em relação aos outros parâmetros clínico-patológicos estudados, como pode ser observados na tabela 1.

A média da densidade de microvasos observada nesta amostra foi de $9,5 \pm 2$.

CONCLUSÃO

Angiogênese refere-se ao desenvolvimento de novos vasos a partir da vasculatura pré-existente, processo fundamental não só para o crescimento tumoral, como também para a disseminação de células tumorais para a circulação sangüínea e no crescimento de micrometástases dormentes para lesões francamente metastáticas [19]. O papel da angiogênese foi descrito por Folkman [16], que primeiro postulou, em 1971, que tumores sólidos poderiam permanecer dormentes até um tamanho de somente 2 a 3mm, na ausência de neovascularização, sendo seu tamanho limitado pela difusão de oxigênio e nutrientes. Pesquisas subsequentes, conforme revisão realizada por este mesmo autor em 1990, mostraram evidências claras, tanto em estudos experimentais quanto em humanos, que o crescimento tumoral é “angiogenese-dependente” [17]. O processo de angiogênese envolve múltiplas etapas, seqüenciais e interdependentes, iniciando com a degradação da membrana basal que circunda os capilares, seguida da invasão do estroma circunjacente em direção ao estímulo angiogênico. A migração das células endoteliais é acompanhada pela sua proliferação e organização em estruturas tridimensionais, as quais se ligam a outras estruturas similares e formam uma rede de novos vasos.

As células tumorais podem superexpressar fatores angiogênicos estruturalmente ou responder a estímulos externos para que eles se expressem. O principal estímulo externo para a expressão destes fatores é a hipóxia, que induz uma cascata de vias de sinalização que levarão ao aumento da transcrição de vários fatores angiogênicos [15,19,22].

Na última década, observa-se uma dicotomia no que se refere as pesquisas da angiogênese no câncer: por um lado a busca da quantificação da angiogênese para avaliação do prognóstico tumoral e, de outro, a tentativa de inibição da angiogênese para frear o crescimento tumoral. Atualmente, observa-se progresso significativo em ambas direções, sendo que vários agentes anti-angiogênicos têm sido testados em ensaios clínicos e o papel da terapia anti-angiogênica têm sido revisada em recentes artigos [11,15,16,22]. Assim, além de objetivar-se a inibição da atividade de agentes pró-angiogênicos ou utilizar-se de agentes

inibidores da angiogênese, um outro aspecto novo em pesquisa é a busca de alvo seletivo nas células endoteliais de vasos sangüíneos associados ao tumor. Uma vez que a proliferação da células endoteliais associadas a neovasculatura tumoral ocorre 20 a 2000 vezes mais rapidamente que aquela observada na vasculatura dos tecidos normais [25], moléculas superexpressas em células endoteliais ativamente proliferativas representam possíveis alvos para terapêutica anti-angiogênica.

A expressão do CD105 está restrita basicamente, às células endoteliais vasculares, nas quais altos níveis desta proteína são detectáveis. O CD105 é fracamente expresso em células hematopoiéticas progenitoras, fibroblastos, estromais e macrófagos e está ausente ou pode ser encontrado em escassa quantidade em células endoteliais linfáticas da pele de humanos. De acordo com a noção de que a angiogênese é regulada positivamente pela hipóxia e que o CD105 é superexpresso na neovasculatura de tecidos angiogênicos, foi demonstrado que níveis de ativação de CD105 são moderadamente regulados por hipóxia, via fator indutor de hipóxia (HIF-1), e que condições de hipóxia e TGF- β 1 cooperam para induzir a expressão de CD105 [13].

Em tumores malignos o CD105 quase exclusivamente expressa-se nas células endoteliais dos vasos sangüíneos peri e intratumorais e em componentes do estroma tumoral. Além disso, pequenos e, provavelmente, imaturos vasos tumorais (alto índice de proliferação) são, principalmente, corados por anticorpos monoclonais anti-CD105, como demonstrado em tumores de próstata [15] e mama [18]. Estudos recentes realizados em modelos animais com neoplasia de mama e cólon, utilizando o anti-corpo anti-CD105 conjugado com imuno-toxinas e imuno-radioisótopos demonstraram uma eficiente supressão do crescimento tumoral, sem significativos para-efeitos sistêmicos [16].

O CD105 é considerado um poderoso marcador para quantificar a densidade de microvasos intra-tumorais em tumores sólidos e hematopoiéticos incluído o tumor de mama, próstata, colo-retal, tumor de pulmão (não de pequenas células) e mieloma múltiplo [15,26,27]. Um incremento na densidade vascular identificado com imunocoloração para CD105, foi encontrado durante a progressão de estágios da carcinogênese colo-retal, sugerindo que a

taxa de neovascularização, utilizando o CD105 como marcador, pode representar um preditor de desenvolvimento do câncer colo-retal [26]. Além disso, a densidade de microvasos intratumoral tem demonstrado ser um indicador prognóstico independente para algumas neoplasias malignas, sendo que uma densidade microvascular intratumoral aumentada se correlaciona, diretamente, com menor sobrevida em diferentes tumores sólidos [14,16,28,29]. O uso do CD105 como alvo para o tratamento de tumores sólidos tem sido experimentalmente validado em ratos.

Desta forma, muitos estudos têm, realmente, encontrado associação entre densidade microvascular intratumoral e a expressão do fator angiogênico, crescimento tumoral e ocorrência de metástases à distância, sugerindo que a densidade de microvasos não só quantifica a morfologia vascular como oferece importante informação sobre o grau e funcionamento da vasculatura tumoral [30], sendo que a maior parte destes trabalhos emprega o método baseado no trabalho pioneiro de Weidner et al [31]. Estes trabalhos têm mostrado que um aumento na densidade microvascular, como uma medida de angiogênese, é uma poderosa ferramenta no prognóstico de muitos tipos de tumores em humanos. Contudo, devido, provavelmente, à diferenças e problemas na metodologia, nem todos os investigadores têm sido capazes de confirmar que tumores altamente vascularizados estejam associados com uma redução na sobrevida. As considerações mais importantes em relação a variabilidade na quantificação da angiogênese tumoral em cortes de tecido são a escolha do anticorpo endotelial, a seleção da área de tumor a ser analisada, o parâmetro vascular a ser mensurado, os métodos de análise e ponto de corte usado na associação com outras variáveis clínico-patológicas e sobrevida.

O índice de Chalkley é o número de pontos da gráticula que coincidem com vasos corado, obtido a partir da média de microvasos contados em três “hot-spots”. Embora pretenda traduzir uma estimativa da densidade microvascular tumoral, este índice, realmente avalia a expressão relativa de vasos corados imuno-histoquimicamente em uma área representado por um índice, sem unidade. Entretanto, a área estimada pode, biologicamente, representar um

importante parâmetro referente à capacidade do tumor modificar o seu suprimento sangüíneo ou o efeito parácrino nos vasos.

Esta técnica foi recomendada em consenso internacional [22], e a sua contribuição metodológica na variação inter-observacional, tende a ser menor que aquela que ocorre nos métodos mais freqüentemente usados para avaliar a densidade de microvasos.

Poucos estudos foram realizados para avaliar a importância da angiogênese no carcinoma de vesícula [17,28,32]. Sugawara et al [32], utilizando o CD34 para avaliar a densidade microvascular intratumoral no carcinoma de vesícula, não observou associação entre a neovascularização e o prognóstico tumoral, sugerindo que a angiogênese intratumoral tem importância limitada na disseminação do câncer. Entretanto, o CD34 é um marcador celular pan-endotelial podendo não refletir a exata atividade angiogênica tumoral. De acordo com alguns relatos prévios, o CD105 é um marcador endotelial que parece reagir somente com as células endoteliais de vasos neoformados, em particular com vasos sangüíneos tumorais imaturos [33]. Além disso, estudos em outras neoplasias têm sugerido que índices de densidade microvascular intratumoral, com CD105 imunocorado podem ser superiores àqueles índices obtidos usando CD34, em termos de informação prognóstica [27,33].

Kitamura et al [28] avaliaram a angiogênese no carcinoma de vesícula utilizando CD105, entretanto usaram outros métodos para quantificação da angiogênese tumoral.

Giatromanolaki et al. [17] avaliaram a densidade de microvasos em neoplasias da vesícula biliar usando CD31, e observaram que uma densidade microvascular alta define um pior prognóstico, mesmo dentro do grupo de carcinomas bem diferenciados de vesícula. Convém ressaltar, que o CD31, embora tenha menor especificidade para vasos neoformados que o CD105, reconhece a maioria dos capilares e tem obtido confiável imuno-coloração de microvasos em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina. Entretanto, este autor não utilizou o método de Chalkley para contagem destes vasos [19,34,35].

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a densidade de microvasos intratumoral pelo CD105 imunocorado, usando a contagem de Chalkley, em câncer de vesícula. E, embora não tenhamos observado diferenças estatisticamente significantes

quando analisamos a densidade microvascular média, em relação aos parâmetros clínico-patológicos analisados, convém ressaltar que estes valores oscilaram entre 5 e 14, e que no carcinoma de mama, em que a densidade microvascular intratumoral (avaliada com a mesma técnica que utilizamos) é considerada como fator prognóstico independente, os pontos de corte do índice de Chalkley estão entre 5 e 7 [18]. Ou seja, se o índice de Chalkley é abaixo de 5, o caso é considerado de baixa densidade de microvasos, entre 5 e 7, média, e acima de 7, alta. Então, a maioria dos nossos casos se apresentaria com índices médios ou altos (figura 2), se considerássemos estes pontos de corte para o carcinoma de vesícula.

Devemos considerar ainda, a possibilidade de que não tenhamos observado diferenças estatisticamente significantes na densidade microvascular intratumoral nos diferentes estágios da doença e graus histológicos, provavelmente devido ao tamanho da amostra analisada. Em nossa série anterior de 60 casos de carcinoma de vesícula, observamos, em relação a sobrevida, uma mediana de 3,9 meses [6]. Este fato, sem dúvida, torna difícil a análise deste parâmetro. Não utilizamos tercis para a análise da DMV, pois a estratificação em grupos ainda menores poderia ocasionar perda do poder estatístico, entretanto se o fizéssemos, os pontos de corte seriam 8 e 10 (correspondendo a 33% e 66% respectivamente).

Desta forma, com a observação dos nossos casos, em que a maioria deles apresenta uma densidade vascular expressiva, resta saber se este fato está associado a um comportamento mais agressivo desta neoplasia, e se a utilização do CD105 como alvo para terapia antiangiogênica resultará em resposta clínica significativa. Entretanto, apenas estudos com amostras mais significativas (que estão em andamento no nosso serviço) associada a análise da sobrevida, poderão responder estes questionamentos. O importante é que se utilize, em futuras pesquisas, uma metodologia standardizada por consenso, como o método de Chalkely, e que se uniformize, também, a escolha do anticorpo endotelial.

Table 1. Análise da associação da densidade microvascular com parâmetros clínico-patológicos e fatores prognósticos no carcinoma de vesícula

Parâmetro	No.de casos	DMV	valor de p
Idade			
<50 anos	2	9,67 ± 2,82	0,918*
≥50 anos	26	9,51 ± 2,01	
Sexo			
Feminino	23	9,42 ± 2,13	0,568*
Masculino	5	10,00 ± 1,43	
Grau histológico			
Bem diferenciado	3	10,67 ± 2,91	0,139*
Moderadamente diferenciado	9	10,30 ± 1,80	
Pouco diferenciado	16	8,88 ± 1,84	
Estádio TNM			
I e II	7	8,81 ± 2,44	0,288*
III e IV	21	9,76 ± 1,86	

* valores de p não-significantes

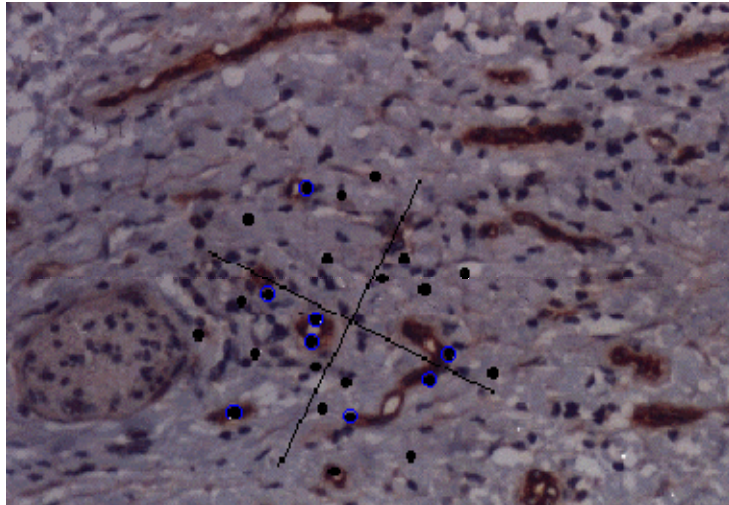


Figura 1. Exemplo (ilustrado) do método de Chalkley em um hot-spot (X200). Pontos sobre vasos corados estão marcados com círculos azuis. A área da gráticula é 0.196mm^2 .

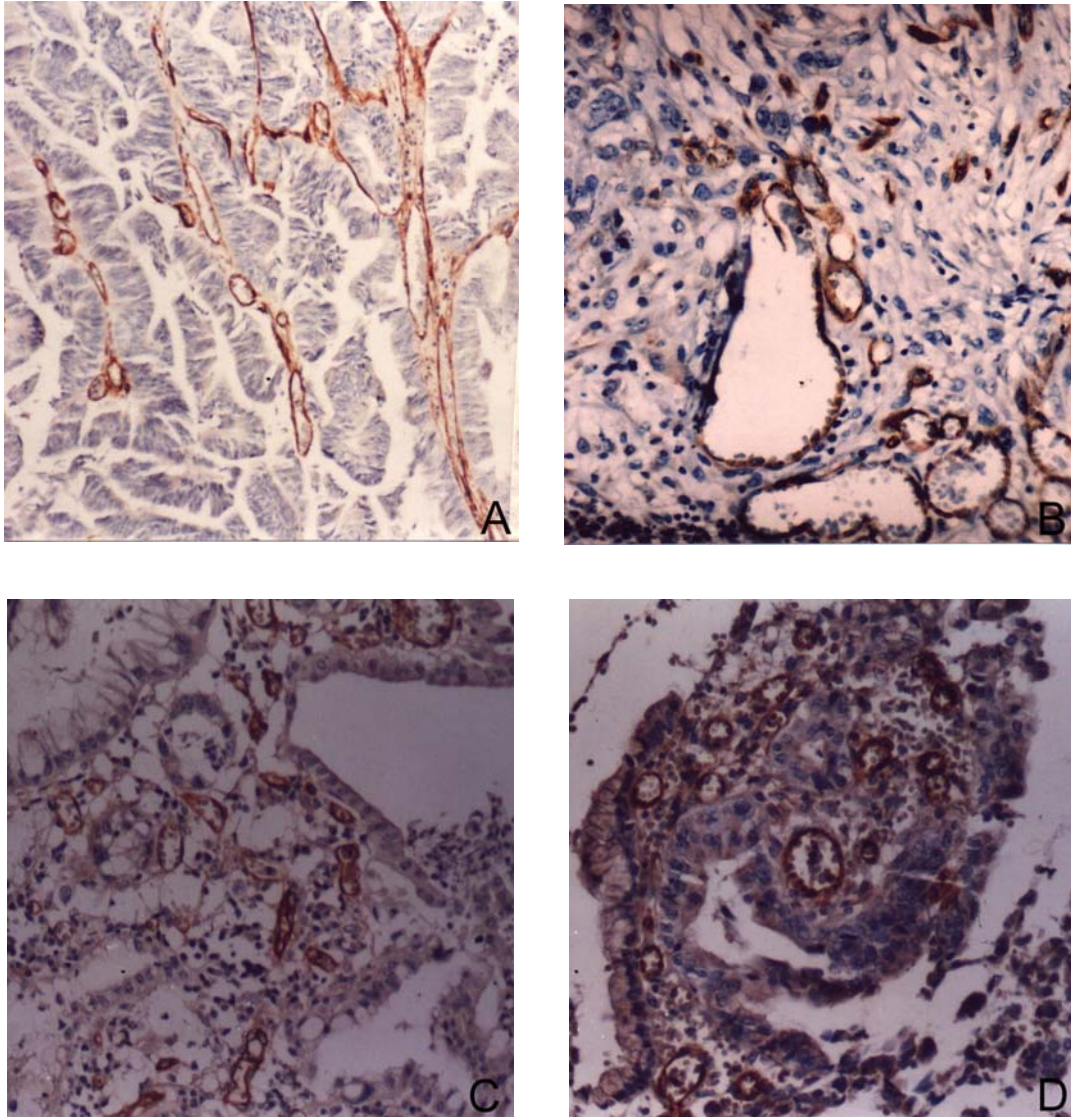


Figura 2. Imuno-reatividade do CD105 em células endoteliais de vasos sangüíneos neoformados mostrando alta densidade de microvasos. (A) Carcinoma de vesícula bem diferenciado (B) Carcinoma de vesícula moderadamente diferenciado (C,D) Cancer de vesícula pouco diferenciado.

BIBLIOGRAFIA

1. Wistuba II; Gazdar AF. Gallbladder Cancer: Lessons from a rare tumor. *Nat Ver Cancer* 2004; 4(9): 695-706.
2. Greenlee RT; Hilll Harmon MB; Murray T; et al. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51:15-36, 2001.4.Henson DE; Albores-Saavedra J; Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6):1493-1497.
3. Pandey M; Pathak AK; Amitabh G. Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6):1145-1151.
4. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
5. Tazuma S; Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3): 224-229.
6. da Rocha, AO; Coutinho LMB; Scholl JG; Leboutte LDP. The value of p53 protein expression in gallbladder carcinoma: Analysis of 60 cases. *Hepato-Gastroenterology* 2004; 51: 1810-1814.
7. Lazcano-Ponce EC; Miquel JF; Muñoz N; et al. Epidemology and molecular pathology of gallbladder cancer. *Cancer J Clin* 2001; 51: 349-364.
8. Kaushik SP. Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8): 848-854.1. Wistuba II; Gazdar AF. Gallbladder Cancer: Lessons from a rare tumor. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(9): 695-706.
9. Brumini R; Torloni H; Henson DE; Gotieb SLD; Souza JMP. Câncer no Brasil - Dados Histopatológicos - 1976—1980. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982.
10. Atlas de mortalidade por cancer: *Inca* 1995-1999. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2000.
11. Brem S. Angiogenesis and cancer control: from concepts to therapeutic trial. *Cancer Control* 1999; 6(5): 436-458.
12. Poon RT-P; Fan S-T and Wong J. Clinical Implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4): 1207-1225.

13. Fonsatti E; Altomonte M; Nicotra MR; et al. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessel. *Oncogene* 2003; 22: 6557-6563.
14. Duff SE; Li C; Garland JM; et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potencial applications. *FASEB J* 2003; 17: 984-992.
15. Wikstrom P; Lissbrant IF; Sattin P; et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature bold vessels and is marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51: 268-275.
16. Fonsatti E; Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2(1):18.
17. Giatromanolaki A; Sivridis E; Koukourakis MI; et al. Prognostic role of angiogenesis in operable carcinoma of the gallbladder. *Am J Clin Oncol* 2002; 25(1): 38-41.
18. Hansen S; Grabau DA; Sorensen FB; et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkely counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:139-146.
19. Fox SB; Harris AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Investigational New Drugs* 1997; 15: 15-28.
20. Fox SB; Harris AL. Histological quantification of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004; 112 (7-8): 413-430.
21. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of Tissues. *J Nat Cancer Inst* 1943; 4: 47-53.
22. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
23. Fox SB; Leek RD; Weeks MP; et al. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177: 275-283.
24. Sato T; Koyama K; Yamaguchi H; et al: Early carcinoma of gallbladder. *Gastroenterol Jpn* 1981;16: 459-464.
25. Herlyn M. Endothelial cells as targets for tumor therapy. *J Immunother* 1999; 22: 185.

26. Akagi K; Ikeda Y; Sumiyoshi Y; et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131(1): 109-113.
27. Tanaka F; Otake Y; Yanagihara K; et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer res* 2001; 7: 3410-3415.
28. Kitamura K; Kasuya K; Tsuchida A; et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta in gallbladder cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 327-332.
29. Hlatky L; Hahnfedt P; Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-893.
30. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Quantification of angiogenesis in solid tumours: an international consensus on the methodology and criteria evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 14: 2474-2484.
31. Weidner N; Semple JP; Welch WR; et al. Tumor angiogenesis: and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl j Med* 1991; 324:1-8.
32. Sugawara Y; Makuuchi M; Harihara Y; et al. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 1999; 46: 1682-86
33. Ho J W; Poon RT; Sun CK; et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11(2): 176-181.
34. Horak ER; Leek R; Klent N; et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340:1120-1124.
35. Parum D; Cordell J; Micklem K; et al. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-757.

ARTIGO 2- PORTUGUÊS

Título: Valor Prognóstico da Angiogênese pelo Método de Chalkley no Carcinoma de Vesícula Biliar

Autores: Andréa Oxley da Rocha

Lígia Maria Barbosa Coutinho

João Grigoletti Scholl

Instituição: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre - Programa de Pós-graduação em Patologia

Palavras-chave: gallbladder neoplasm, CD105, angiogenesis

RESUMO

OBJETIVO: A angiogênese tumoral tem sido proposta como essencial ao crescimento tumoral, proliferação e, eventualmente, metástases e, embora para vários tumores sólidos malignos uma densidade microvascular aumentada esteja associada a um mal prognóstico, para a neoplasia de vesícula biliar, estes dados permanecem obscuros. Assim, realizamos este estudo com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da angiogênese, medida através do método de Chalkley, utilizando o CD105 como marcador endotelial, em espécimes cirúrgicos de carcinoma de vesícula biliar.

MATERIAL E MÉTODOS: Trinta casos de carcinoma de vesícula foram estudados por técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD105 para identificação de vasos neoformados intratumorais. A densidade vascular intratumoral foi avaliada através da utilização do método de Chalkley, e pesquisada a associação deste índice com a sobrevida e os fatores prognósticos validados para esta neoplasia.

RESULTADO: a partir da análise dos nossos dados, foi obtido um ponto de corte na densidade vascular tumoral em 8,5, considerando os casos acima deste valor como de alta densidade vascular. Foi observada associação entre densidade microvascular intratumoral elevada e sobrevida inferior a 6 meses ($p=0,026$). Não observamos associação entre densidade vascular e os fatores prognósticos avaliados.

CONCLUSÃO: O presente estudo confirma a hipótese de que uma densidade vascular elevada, avaliada pelo método de Chalkley, está associada a um pior prognóstico nos portadores de carcinoma de vesícula, entretanto estudos com maiores amostras são necessários para que se confirmem estes dados.

INTRODUÇÃO

A angiogênese consiste na formação de novos capilares a partir da vasculatura pré-existente. Este é um processo fundamental ao crescimento tumoral e foi descrito por Folkman¹ que primeiro postulou, em 1971, que tumores sólidos poderiam permanecer dormentes até um tamanho de 2 a 3mm, na ausência de neovascularização, sendo seu tamanho limitado pela difusão de oxigênio e nutrientes dos tecidos circunjacentes².

Diferente do que ocorre em condições fisiológicas, o delicado equilíbrio da modulação entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos está alterado no “ambiente tumoral”, o que afeta a função de diversos tipos celulares e pode induzir ao crescimento vascular anormal. Assim, a proliferação das células endoteliais associadas a neovascularização tumoral ocorre 20 a 2000 vezes mais rapidamente que aquela observada na vasculatura dos tecidos normais³. Este processo de neoformação vascular é necessário não só para o crescimento tumoral, mas também está envolvido na progressão inicial de lesões pré-malignas para o câncer, na disseminação de células tumorais para a circulação sanguínea e no crescimento de micrometástases dormentes para lesões francamente metastáticas⁴.

Embora seja reconhecido que o tecido neoplásico é mais densamente vascularizado que o tecido normal, somente depois da hipótese de Folkman¹ sobre a antiangiogênese, é que métodos quantitativos para medir a angiogênese em lâminas de tecido, passaram a ser propostos. A origem clonal da atividade angiogênica, sendo heterogeneamente distribuída dentro do tumor, tem sido usada como argumento para quantificar a angiogênese em áreas de mais intensa neovascularização denominadas “hot-spot”. Assim, os estudos de avaliação da densidade vascular tumoral têm sido baseados, principalmente, na utilização dos “hot-spots”, usando uma técnica de contagem de microvasos por coloração imuno-histoquímica específica para células endoteliais ou grupo de células, sob microscopia. Entretanto, diferentes estudos têm utilizado diferentes técnicas. Um destes métodos utiliza a graticula de Chalkley com 25 pontos projetados sobre o “hot-spot”. Esta técnica, sugerida como padrão em Consenso

Internacional de Metodologia e Critérios de Avaliação da Angiogênese⁵ é considerada rápida e facilmente reprodutível.

Muitos estudos têm definido o papel do CD105 como um poderoso marcador para quantificar a densidade de microvasos em tumores sólidos e hematopoiéticos incluído o câncer de mama⁶, próstata⁷, cólon-retal⁸ e pulmão⁹ (não de pequenas células).

O CD105 (endoglina) é uma glicoproteína expressa na superfície celular (membrana) sendo um componente do complexo receptor do TGF- β (Fator de Crescimento transformante). O TGF- β é um dos fatores de crescimento que regula várias funções celulares, incluindo a proliferação, diferenciação, migração, síntese da matriz extracelular, estando particularmente envolvido na angiogênese¹⁰. Esta glicoproteína expressa-se, quase exclusivamente, nas células endoteliais dos vasos sanguíneos peri e intratumorais^{11,12,13}. Além disso, vasos tumorais pequenos e imaturos (com alto índice de proliferação) são, principalmente, corados por anticorpos monoclonais anti-CD105, como demonstrado em tumores de próstata e mama.

A densidade de microvasos intratumoral, determinada usando anticorpos anti-CD105 tem demonstrado ser um indicador prognóstico independente para algumas neoplasias malignas, sendo que uma densidade microvascular intratumoral aumentada se correlaciona, diretamente, com menor sobrevida^{11,14,15}. Entretanto, possivelmente devido a diferentes técnicas empregadas e problemas de metodologia, vários pesquisadores não têm obtido êxito em confirmar a hipótese de que tumores densamente vascularizados estejam associados à redução da sobrevida¹⁶.

Embora para várias neoplasias malignas humanas a densidade vascular intratumoral aumentada esteja associada com piores prognósticos, na neoplasia de vesícula biliar este fato não está estabelecido. Além disso, poucos estudos foram realizados para avaliar a importância da angiogênese no carcinoma de vesícula^{14,17,18,19,20,21}, com resultados divergentes.

Assim, realizamos este estudo com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da angiogênese medida através do método de Chalkley, utilizando o CD105 como marcador endotelial, em espécimes cirúrgicos de carcinoma de vesícula biliar.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta casos de carcinoma de vesícula foram selecionados dos arquivos do Departamento de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Todos os espécimes foram provenientes de ressecção cirúrgica da vesícula biliar ou biópsia tumoral. Os prontuários hospitalares destes pacientes foram revisados para obtenção dos dados clínicos pertinentes.

A avaliação da associação entre a densidade vascular tumoral e o prognóstico desta neoplasia foi realizada utilizando os fatores prognósticos validados Henson²² em 1992, que incluem a classificação pTNM (*American Joint Committee on Cancer/ International Union Against Cancer 2004*) para avaliação do estágio da doença, além do grau e tipo histológico das lesões. Para fins de análise estatística agrupamos os casos de carcinoma de vesícula em duas categorias: precoces (pTNM I e II) e avançados (pTNM III, IV) de acordo com os critérios de Sato et al²³. Dados sobre sobrevida foram obtidos da Secretaria de Saúde do Estado.

Técnica imuno-histoquímica

A partir dos blocos de parafina novas lâminas foram confeccionadas para confirmar o diagnóstico histológico e selecionar o bloco mais representativo de cada caso. Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados com etanol e água. Um tratamento preliminar, para recuperação antigênica foi aplicado por aquecimento das lâminas no microondas em EDTA, revertendo o efeito da fixação pelo formol. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das lâminas em solução com H₂O₂ 0,3% e metanol por 30 min. A seguir as lâminas foram lavadas com PBS a 4°C e após em soro normal (Protein Block Serum. DAKO). O anticorpo primário utilizado foi o anti-CD105 (NCL-CD105, monoclonal, Novocastra Laboratories LTDA, UK), permanecendo durante a noite em refrigerador a 4°C. Após nova lavagem com PBS, os cortes foram encubados com anticorpo secundário por 30 min e a seguir em complexo biotina-peroxidase (Novocastra Kit) por 40 min e, então, lavados com PBS. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com DAB (diamino benzidine-tetracloro) e contra-

corada com hematoxilina. Foi utilizado como controle positivo cortes de amígdala e, negativo, lâminas deste mesmo tecido, substituindo-se o anticorpo primário por soro fisiológico. Foram considerados como positivos somente aqueles casos no qual houve inequívoca coloração homogênea do citoplasma e membrana das células endoteliais em marron.

Quantificação dos microvasos

A avaliação da densidade vascular foi realizada utilizando o método de contagem de Chalkley. Três áreas de maior vascularização (“hot-spot”) foram escolhidas em cada lâmina examinada em menor aumento (100X). Em maior aumento (200X) a graticula de Chalkley, com 25 pontos, foi aplicada para cada “hot-spot”, e orientada para permitir o máximo de pontos coincidentes com as estruturas vasculares imuno-histoquimicamente coradas. Qualquer célula endotelial corada, isolada ou formando grupos de células que estivessem claramente separadas de vasos adjacentes por células tumorais ou outro tecido conectivo, foi considerado microvaso^{21,24,25,26}. O índice final foi obtido calculando-se a média entre os três campos contados, para cada caso (figura1).

Análise estatística

Para definir o ponto de corte na densidade vascular, realizou-se uma análise do diagrama de dispersão traçado entre o tempo de sobrevida e a densidade vascular (índice de Chalkley) estabelecendo-se o ponto de corte em 6 meses (figura 2). Procedeu-se com a curva ROC a fim de verificar o ponto de corte da densidade vascular, de acordo com a sensibilidade e especificidade, obtendo-se corte no valor 8,5. A Associação entre as demais variáveis foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. Os casos foram agrupados em duas categorias conforme a densidade vascular: alta, quando este índice foi maior ou igual a 8,5 e baixa, quando o valor foi inferior à 8,5.

A análise da sobrevida foi realizada através da curva de Kaplan-Meier (figura 3).

RESULTADOS

Nos 30 casos estudados a média de idade foi de 62 anos, sendo que 86,2% dos pacientes se apresentavam com mais de 50 anos ao diagnóstico. Oitenta e três por cento dos pacientes (25) eram do sexo feminino. Não se observou associação entre a densidade microvascular e estes parâmetros.

Oitenta por cento dos pacientes foram diagnosticados em fases avançadas da doença (estádios III e IV). Todos os resultados dos fatores prognósticos avaliados podem ser observados na tabela 1.

Não observamos significância estatística nas diferenças encontradas na análise dos diferentes fatores prognósticos e a densidade vascular intratumoral. Entretanto, a análise da densidade vascular intratumoral mostrou associação de alta densidade (índice \geq 8,5) com uma sobrevida abaixo de 6 meses($p<0,026$) (tabela2).

Setenta e cinco por cento dos pacientes (18) apresentaram sobrevida inferior a 6 meses, sendo a média de 7,18 (desvio padrão 1,09) meses e mediana de 4,83 meses (figura 3).

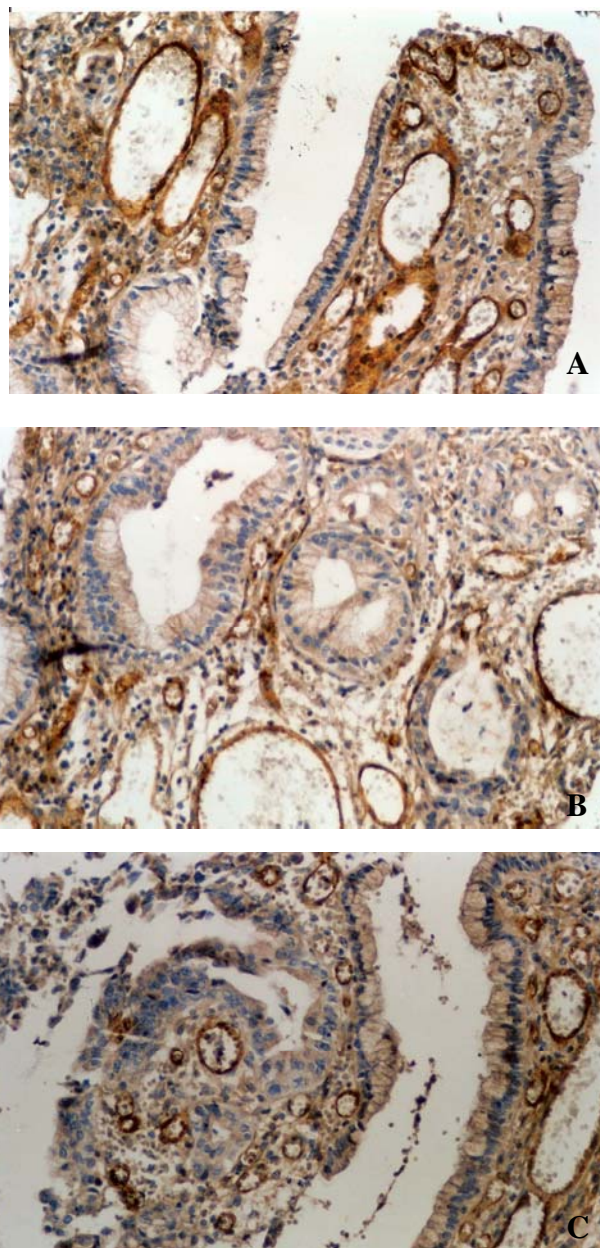


Figura 1. (A,B,C) Três hot-spot selecionados em áreas de alta densidade de microvasos em adenocarcinoma vesícula (100X).

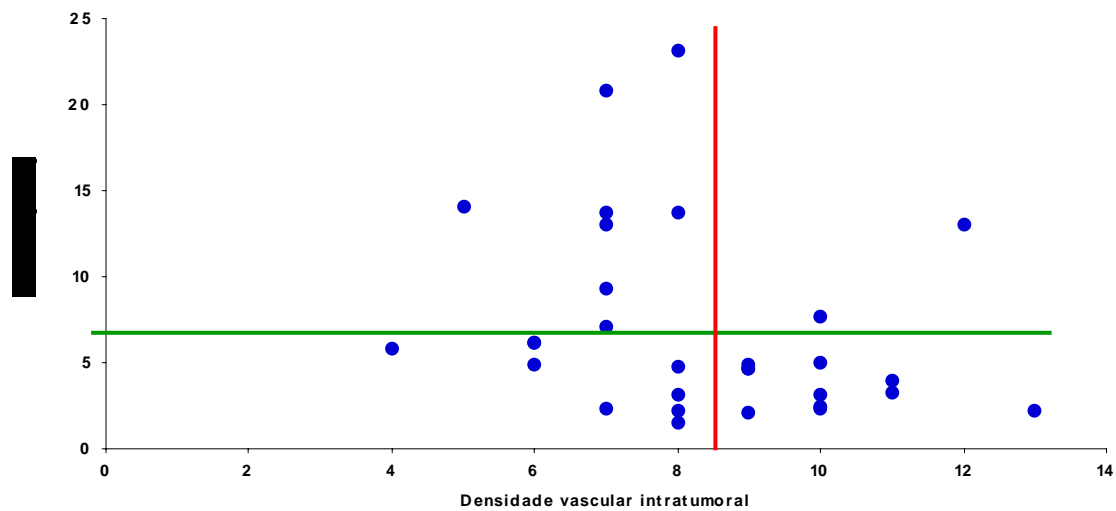


Figura 2. Curva de dispersão da sobrevida e índice de densidade

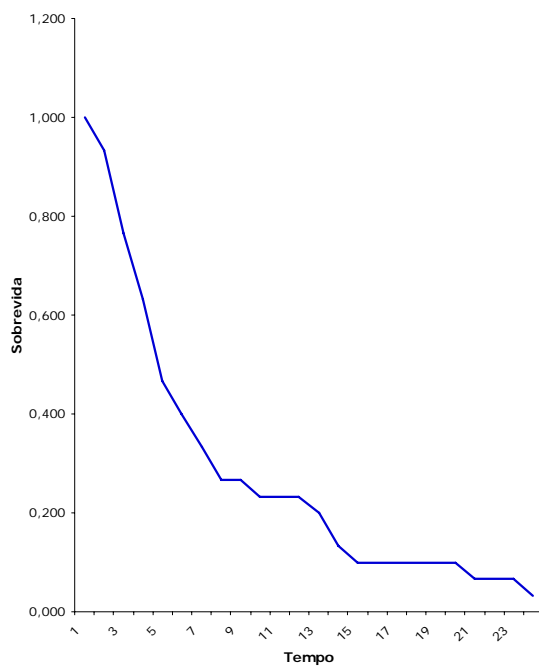


Figura 3. Curva de sobrevida dos pacientes com carcinoma de vesícula

Tabela 1. Análise da associação entre fatores prognósticos, sobrevida e densidade microvascular intratumoral (DMV)

Fator prognóstico	Nº. casos	sobrevida até 6 meses	DMV ALTA ($\geq 8,5$)
Tipo histológico			
Adenocarcinoma	24	13 (54,1%)	12(50,0%)*
Adenoescamoso	6	5 (83,3%)	1 (16,7%)*
Grau histológico [†]			
Bem diferenciado	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)*
Moderadamente diferenciado	15	6 (53,6%)	6 (40,0%)*
Pouco diferenciado	6	5 (83,3%)	5 (83,3%)*
Estádio TNM			
I e II	6	2 (33,3%)	1 (16,7%)*
III e IV	24	16 (67,7%)	12 (50,0%)*

* valores de p não significantes

† referente aos 24 casos de adenocarcinoma

Tabela 2. Associação entre a densidade microvascular intratumoral (DMV) e a sobrevida

DMV	SOBREVIDA	
	Até 6 meses	Acima de 6 meses
<8,5	7 (41,2%)	10 (58,8%)
$\geq 8,5$	11 (84,6%)*	2 (15,4%)*

*p0,026

DISCUSSÃO

Embora para várias neoplasias malignas humanas como o carcinoma de mama²⁷, pulmão²⁸ e cólon-retal²⁹, uma angiogênese intratumoral elevada tenha sido associada à mau prognóstico, para os tumores do trato biliar, este aspecto permanece, ainda, pouco explorado.

Sugawara et al.¹⁸, avaliaram a densidade microvascular intratumoral em 40 casos de carcinoma de vesícula, utilizando o CD34 como marcador endotelial e não observaram associação entre a neovascularização e o prognóstico tumoral, sugerindo que a angiogênese apresente importância limitada na disseminação e crescimento desta neoplasia. Outros pesquisadores, porém, relatam associação entre outros fatores angiogênicos e o carcinoma de vesícula. Okita et al.²⁰ encontraram associação entre a expressão do VEGF e a progressão tumoral nesta neoplasia. Hida et al.³⁰ encontraram associação entre VEGF e mau prognóstico em carcinomas de via biliar extra-hepática. Gohongi et al.¹⁷ também observaram expressão de TGF- β 1 nas células tumorais do epitélio em poucos casos de carcinoma de vesícula biliar, independente do tipo histológico avaliado.

O valor da angiogênese para prever o prognóstico de 48 pacientes portadores de carcinoma de vesícula estágios I a III, submetidos à colecistectomia simples, foi estudado por Giatromanolaki et al.²¹, utilizando o marcador endotelial CD31. Estes autores observaram que uma densidade vascular alta definiu mau prognóstico, mesmo em portadores de carcinomas bem diferenciados e propõe que a densidade microvascular intratumoral seja considerada um fator prognóstico independente para esta neoplasia.

Kitamura et al.¹⁴, em 2003, estudaram a expressão do TGF- β em 45 casos de carcinoma de vesícula, buscando associação com a angiogênese (CD-34 e CD105). A expressão do TGF- β foi observada em 25 casos, havendo associação entre a expressão do TGF- β e o aumento da proliferação vascular tumoral (CD105). Esta associação não foi observada com o CD34. Kalekou and Miliaras³¹, observaram associação entre o aumento progressivo da densidade vascular tumoral e o aumento da profundidade de invasão tumoral na parede da vesícula biliar, ao estudar 33 casos de carcinoma deste órgão, utilizando fator

VIII Ag. Concluíram, a partir de seus resultados que a densidade vascular está envolvida na evolução do carcinoma de vesícula. Resultado completamente diverso foi descrito por Giatromanolaki et al.²¹. Estes resultados devem ser avaliados com cautela, uma vez que a escolha do anticorpo primário influi, diretamente, no número de vasos avaliados, dependendo da especificidade do mesmo para células endoteliais de vasos neoformados. O fator VIII Ag identifica apenas uma proporção do endotélio vascular, além de identificar linfáticos endoteliais.

Estudos em diferentes neoplasias têm sugerido que escores de densidade vascular intratumoral, utilizando imuno-histoquímica com CD105, pode ser superior (maior especificidade) àqueles escores obtidos usando o CD34 e CD31 (marcador pan-endotelial), em termos de informação prognóstica^{9,25,32}.

Além disso, poucos estudos avaliaram a densidade vascular, no carcinoma de vesícula, através da contagem de vasos em “hot-spot”^{14,18,21,31}, utilizando anticorpos primários com graus variáveis de especificidade para vasos neoformados. O número de “hot-spots” selecionados variou nos estudos descritos, assim como o anticorpo primário selecionado, o aumento microscópico utilizado para aferição dos dados, e principalmente, a definição de quais estruturas a serem contadas. Esta grande variabilidade na metodologia utilizada, certamente reflete-se na discordância dos resultados e conclusões observados.

Em nosso estudo, utilizamos o índice de Chalkley que consiste no número de pontos da gráticula que coincidem com vasos corados, obtido a partir da média de microvasos contados em três “hot-spots”. Embora pretenda traduzir uma estimativa da densidade microvascular tumoral, ele, realmente, avalia a expressão relativa de vasos corados imuno-histoquimicamente em uma área, representado por um índice, sem unidade. Entretanto, a área estimada (“hot-spot”) pode representar um importante parâmetro referente a capacidade do tumor de modificar o seu suprimento sangüíneo ou o efeito parácrino nos vasos. Estas áreas de maior densidade vascular intratumoral parecem ser regiões de maior importância biológica, possivelmente, por apresentarem clones de células tumorais com elevado potencial angiogênico e, conseqüentemente, maior probabilidade de disseminação²⁶.

A técnica de contagem de Chalkley foi recomendada por um consenso internacional⁵, e existem relatos, bem delineados, de sua fácil reprodutibilidade²⁴, que demonstram que a variabilidade interobservacional tende a ser menor do que nos demais métodos utilizados.

Utilizando um anticorpo com maior especificidade para os vasos neoformados, identificados por técnica imuno-histoquímica adequada, e método preconizado por consenso⁵, observamos que os tumores com densidade vascular elevada, ou seja, com índice $\geq 8,5$, estavam associados, em 84,6% dos casos a uma sobrevida abaixo de 6 meses. O ponto de corte da densidade vascular intratumoral, definido para este estudo, foi determinado a partir da análise da sobrevida da própria amostra, observando-se a distribuição destes pacientes em um diagrama de dispersão (figura 2) entre o tempo de sobrevida e os valores de densidade vascular. Nesta análise, pode-se observar que quando os índices foram maiores ou iguais a 8,5, a quase totalidade dos pacientes sobreviveu menos de 6 meses. E, analisando-se estes casos, não se observou associação entre o tipo histológico, o grau de diferenciação ou o estadiamento do (pTNM) tumor. Isto sugere que mesmo tumores bem diferenciados, que apresentem uma densidade vascular alta, provavelmente, possam apresentar um pior prognóstico, semelhante às observações de Giatromanolaki²¹.

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a densidade de microvasos intratumorais utilizando o CD105, através do método de Chalkley, em casos de carcinoma de vesícula. O presente estudo confirma a hipótese de que uma densidade tumoral aumentada está associada a uma menor sobrevida. No ponto de corte definido em nossa amostra há uma modificação clara no tempo de sobrevida dos pacientes. A sobrevida foi menor que 6 meses quando o índice de Chalkley foi maior ou igual a 8,5 (alta densidade microvascular intratumoral) com uma especificidade de 91,4%. Baseados nestes achados acreditamos que, semelhante ao observado para outras neoplasias^{8,11,24}, uma densidade microvascular elevada está associada a um pior prognóstico para os portadores de carcinoma de vesícula, embora estudos com amostras maiores se façam necessários para confirmação destes resultados.

Assim, o que se espera, é que uma metodologia seja definida como padrão, como o método de Chalkey, e que a seleção do anticorpo mais específico também seja definida. Estas são condições fundamentais para serem executadas em pesquisas futuras, não só para que se possa estabelecer com mais segurança o prognóstico das neoplasias malignas, mas para o desenvolvimento de terapias antiangiogênicas^{11,13,15,32}, dependentes da identificação de um alvo específico para células endoteliais de vasos intratumorais.

BIBLIOGRAFIA

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 82-86.
2. Folkman J. Whats is the evidence that the tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
3. Herlyn M. Endothelial cells as targets for tumor therapy. *J Immunother* 1999; 22: 185
4. Poon RT-P, Fan S-T and Wong J. Clinical Implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4): 1207-25.
5. Vermeulen PB; Gasparini G; Fox SB; et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
6. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2[?]tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Human Pathol* 2004; 35:176-183
7. Wikstrom P, Lissbrant IF, Sattin P, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature bold vessels and is marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51: 268-75.
8. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131(1): 109-113.
9. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis. *Lung Cancer* 2003; 39: 289-96.
10. Blobe GC, Schiellmann WP , Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342(18): 1350-58.
11. Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potencial applications. *FASEB J* 2003; 17: 984-92.
12. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, et al. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessel. *Oncogene* 2003; 22: 6557-63.

13. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2(1):18.
14. Kitamura K, Kasuya K, Tsuchida A, et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta in gallbladder cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 327-32.
15. Hlatky L, Hahnfedt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-893.
16. Reiss M. TGF- β and Cancer. *Microbes Infect* 1999; 1: 1327-47.
17. Gohongi T, Boucher Y, Yun CO, et al. Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor β 1. *Nat Med* 1999; 5: 1203-8.
18. Sugawara Y, Makuuchi M, Harihara Y, et al. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1682-86.
19. Tian Y, Ding Ry, Zhi YH, et al. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for determination of tumor vasclarity. *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 415-419.
20. Okita S, Kondoh s, Shiraishi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor progression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 1998; 12: 1013-1018.
21. Giatromanolaki A; Sivridis E; Koukourakis MI; et al. Prognostic role of angiogenesis in operable carcinoma of the gallbladder. *Am J Clin Oncol* 2002; 25(1): 38-41.
22. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
23. Sato T; Koyama K; Yamaguchi H; et al: Early carcinoma of gallbladder. *Gastroenterol Jpn* 1981;16: 459-464
24. Hansen S; Grabau DA; Sorensen FB; et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkely counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:139-146.
25. Fox SB; Harris AL. Markers of tumor angiogenesis: clinical applications in prognosis and anti-angiogenic therapy. *Investigational New Drugs* 1997; 15: 15-28.

26. Fox SB; Harris AL. Histological quantification of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004; 112 (7-8): 413-430.
27. Horak ER, LeeK R, Klenk N, et al. Angiogenesis assessed by paltelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
28. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Angiogenesis is a significant prognostic marker in operable non small cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 86: 1421-1430.
29. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, et al. Combined role of angiogenesis, bcl-2 and p53 expression in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1999; 86: 1421-1430.
30. Hida Y, Morita T, Fujita M, et al. Vascular endothelial growth factor expression is na independent negative predictor in extrahepatic biliary tract carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 2257-2260.
2231. Kalekou H and Miliaras D. Immunohistochemical study of microvessel density, CD44 (standar form), p53 protein and c-erbB2 in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(7): 812-818.
32. Ho J W, Poon RT, Sun CK, et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *Worl J Gastroenterol* 2005; 11(2): 176-181.