

SABAS CARLOS VIEIRA

**ASSOCIAÇÃO DE ANGIOGÊNESE COM
CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DO
CARCINOMA DO COLO UTERINO**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO

**UNICAMP
2003**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

SABAS CARLOS VIEIRA

**ASSOCIAÇÃO DE ANGIOGÊNESE COM
CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DO
CARCINOMA DO COLO UTERINO**

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, na área de Medicina Interna

Programa de mestrado interinstitucional firmado em agosto de 2000, entre a Universidade Estadual de Campinas, SP e a Universidade Federal do Piauí, PI.

Coordenador do Programa: prof. dr. BENEDITO BORGES DA SILVA (UFPI)

Orientador: prof. dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO (Unicamp)

**UNICAMP
2003**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP V673a
V	EX
TOMBO BCI	54053
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/05/03
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BIB ID 290556

CM00162845-0

V673a Vieira, Sabas Carlos
 Associação de angiogênese com características
 anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino. /
 Sabas Carlos Vieira.
 Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Luiz Carlos Zeferino, Benedito Borges da Silva.
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anticorpos monoclonais. 2 Imunoistoquímica-
 diagnóstico. 3. Anatomia patológica. I Luiz Carlos
 Zeferino. II. Benedito Borges da Silva. III. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de ciências Médicas.
 IV. Título

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**Aluno: SABAS CARLOS VIEIRA****Orientador: prof. dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO****MEMBROS****1. Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade****2. Prof. Dr. Maria Saete Costa Gurgel****3. Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino****Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas****DATA: 14/01/2003**

6/1/2003

*Tenha ânimo forte
Não desista. Persista.
Imite a corrente da água que escoo sem cessar,
apesar dos empecilhos da marcha.
Agora, hoje, ou amanhã, sorria sempre.
Sorrindo, não há mágoa que possa subsistir no seu coração.
Esforce-se.
Recorde que a vitória, para ser verdadeira, precisa ter sido difícil.
Ama o mais que possa.
Com amor, será mais fácil vencer as dificuldades.
Lutar, continuar sempre,
é saber desfrutar o verdadeiro valor da vida.*

Dedico este trabalho...

*... a meus pais, Jesus Vieira e Isabel, que são os
responsáveis direto pela minha chegada até aqui.*

*a minha esposa e companheira, Márcia, pelo constante estímulo
e compreensão pelas longas ausências durante a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

*Ao prof. dr. Benedito Borges da Silva pela dedicação e disponibilidade
na elaboração deste trabalho.*

*Ao prof. dr. Luiz Carlos Zeferino pela sua paciência, contribuição,
disponibilidade e seriedade com que nos ajudou neste trabalho.*

Ao prof. dr. José Vassalo pelas sugestões e pela leitura das lâminas.

*À profa. dra. Glauce Aparecida Pinto pelo exemplo de pessoa,
simplicidade, amizade e disponibilidade para ajudar os pós-graduandos.*

*À profa. Jerúsia Ibiapina de Santana e à Profa. Lina Gomes dos
Santos pela amizade e contribuição na leitura das lâminas.*

À dra. Natália pela disponibilidade e pelo grande interesse que demonstrou na elaboração deste trabalho.

Gislaine pela paciência e disponibilidade em explicar os métodos estatísticos e pela realização da análise estatística deste estudo.

A todos os funcionários da Anatomia Patológica do Hospital São Marcos, em especial a Regina, Santiago e Lucely, pela ajuda, sempre com bom humor, na identificação dos blocos de parafina utilizados neste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental do Caism-Unicamp pela receptividade e disponibilidade na explicação da técnica de imunistoquímica utilizada neste estudo.

Aos biólogos Cristiano e Marise do Laboratório de Patologia Experimental do Caism-Unicamp pela paciência e interesse em nos mostrar as técnicas de imunistoquímica.

Márcia Siqueira, secretária da Diretoria Executiva do Caism, pela contribuição na elaboração deste trabalho, estando sempre disponível a ajudar.

Ao funcionário Carvalho da UFPI pelo apoio.

Ao prof. Antônio Fortes de Pádua Filho pelo incentivo constante e pela permissão da realização deste trabalho na clínica de Ginecologia e Mastologia do Hospital São Marcos.

Ao dr. Alcenor Barbosa de Almeida, diretor do Hospital São Marcos pela permissão na realização deste trabalho nesta instituição.

A todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas (Winter) que contribuíram na minha formação objetivando o êxito deste trabalho.

Aos estudantes de medicina da UFPI Suilane e Wilson pela contribuição na elaboração deste estudo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao prof. George Delsol pela doação do anticorpo monoclonal BNH9

SUMÁRIO

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. SUJEITOS E MÉTODOS	34
3.1. DESENHO DO ESTUDO	34
3.2. TAMANHO AMOSTRAL E SELEÇÃO DOS SUJEITOS	34
3.2.1. Critérios de inclusão	34
3.2.2. Critérios de exclusão	35
3.3. VARIÁVEIS E CONCEITOS	35
3.3.1. Variáveis independentes	35
3.3.2. Variáveis dependentes	37
3.3.3. Variável de controle	37
3.4. TÉCNICA E EXAMES	38
3.4.1. Técnica operatória	38
3.4.2. Seleção do material biológico	38
3.4.3. Processamento laboratorial	38
3.4.4. Cortes histológicos	39
3.4.5. Técnica da imunistoquímica	39
3.4.6. Quantificação da angiogênese	40

3.5. <i>COLETA DOS DADOS</i>	44
3.6. <i>PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS</i>	44
3.7. <i>ASPECTOS ÉTICOS</i>	46
4. RESULTADOS	47
4.1 - <i>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</i>	47
4.2. <i>CARACTERIZAÇÃO DAS ANÁLISES IMUNOISTOQUÍMICAS</i>	50
4.3. <i>ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES DE ANGIOGÊNESE COM AS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS</i>	54
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES	86
9. ANEXOS	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características gerais das pacientes incluídas no estudo.....	27
Tabela 2.	Características anatomopatológicas da amostra de estudo.....	29
Tabela 3.	Características gerais das análises imunoistoquímicas	31
Tabela 4.	Concordância entre os anticorpos anti-CD34 e BNH9 para estimar a densidade de microvasos.....	32
Tabela 5.	Concordância entre os anticorpos anti-CD34 e BNH9 para estimar a densidade de microvasos somente para os casos de adenocarcinoma.....	32
Tabela 6.	Concordância entre os anticorpos anti-CD34 e anti-CD31 para estimar a densidade de microvasos.....	33
Tabela 7.	Concordância entre os anticorpos anti-CD31 e BNH9 para estimar a densidade de microvasos.....	33
Tabela 8.	Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD34	35
Tabela 9.	Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal BNH9.....	37

Tabela 10. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD31	39
Tabela 11. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma escamosos do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD34.....	41
Tabela 12. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma escamosos do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal BNH9.....	42
Tabela 13. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma escamoso do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD31	43

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

bFGF	Fator de crescimento do fibroblasto básico
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DAB	3-3' diaminobenzidina
DMI	Densidade de Microvasos Intratumoral
DMSO	Dimetilsulfóxido
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria
FWW	Fator de von Willebrand
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IC	Intervalo de Confiança
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
OR	<i>Odds ratio</i>
PBS	Tampão fosfato salino (phosphate-buffered saline)

SAICM	Sistema de análise de imagem computadorizada
TAF	Fator Angiogênico Tumoral
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UEA ULEX	Europeaus Lectin I
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Observação especial:

Imunoistoquímica: grafia correta.

Fonte: Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Instituto Antonio Houaiss. Rio de Janeiro, Editora Objetiva, 2001. 2922p.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a associação entre a angiogênese e as características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino, através da densidade de microvasos determinada pela técnica de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais anti-CD34, BNH9 e anti-CD31. Para tal, foi realizado um estudo observacional analítico do tipo transversal, que incluiu 62 pacientes com carcinoma invasivo do colo uterino nos estádios Ib1, Ib2 e IIa da FIGO, que foram submetidas a histerectomia radical com linfadenectomia pélvica no período de janeiro de 2000 a fevereiro de 2002. A mensuração da angiogênese foi feita através da densidade de microvasos que correspondeu à média de microvasos por campo contados em dez campos. A densidade de microvasos foi maior quando se utilizou o anticorpo monoclonal anti-CD34 e BNH9 do que com anti-CD31. O coeficiente de kappa foi de 0,74 (IC 95%=0,56-0,91) quando analisou-se a concordância entre CD34 e BNH9 e os coeficientes de kappa foram de 0,35 (IC 95%=0,12-0,59) e de 0,29 (IC 95%=0,05-0,53), respectivamente, quando analisou-se a concordância entre CD34 e CD31 e entre CD31 e BNH9. Maior densidade de microvasos determinada pelo anticorpo anti-CD34 associou-se com carcinoma do colo uterino do tipo histológico escamoso,

enquanto que com o anti-CD31 associou-se com o carcinoma indiferenciado. Maior densidade de microvasos determinada pelo anticorpo BNH9 associou-se com linfonodos comprometidos no carcinoma escamoso do colo uterino. Quando se utilizou os anticorpos anti-CD34 e BNH9 observou-se tendência de associação com invasão linfática para o carcinoma do colo uterino. Com bases nestes resultados, podemos concluir que a densidade de microvasos é maior quando utilizou-se os anticorpos monoclonais anti-CD34 e BNH9 do que com anti-CD31. A concordância para determinar a densidade de microvasos é melhor entre os anticorpos monoclonais anti-CD34 e BNH9. A atividade angiogênica é mais alta nos carcinomas escamosos, nos carcinomas indiferenciados e nos casos de carcinoma escamoso com linfonodos comprometidos.

SUMMARY

The aim of this study was to analyse the association between angiogenesis and the pathoanatomic features of cervical cancer through microvessel density, determined by an immunohistochemical technique using anti-CD34, BNH9 and anti-CD31 monoclonal antibodies. For this purpose, a cross-sectional analytical observational study was conducted, including 62 patients with Stage Ib1, Ib2 and IIa cervical cancer as described by FIGO. These patients underwent radical hysterectomy with pelvic lymph node resection from January 2000 to February 2002. Angiogenesis was measured through microvessel density which corresponded to the mean number of microvessels per field in 10 fields. Microvessel density was higher when using anti-CD34 and BNH9 monoclonal antibodies compared to using anti-CD31 monoclonal antibody ($p < 0,01$). The kappa coefficient was 0.74 (CI 95%=0.56-0.91) when analysing agreement between CD34 and BNH9. Kappa coefficients were 0.35 (CI 95%=0.12-0.59) and 0.29 (CI 95%=0.05-0.53), respectively, when analysing agreement between CD34 and CD31 and between CD31 and BNH9. Higher microvessel density determined by anti-CD34 antibody was associated with squamous cell cervical carcinoma, whereas it was associated with undifferentiated carcinoma when determined by anti-CD31 antibody. Higher microvessel density determined by BNH9 antibody was associated with lymph node involvement in squamous cell cervical

carcinoma. When anti-CD34 and BNH9 antibodies were used, a trend towards lymphatic invasion was observed in cervical carcinoma. Based on these results, we can conclude that microvessel density is higher when using anti-CD34 and BNH9 monoclonal antibodies compared to using anti-CD31. The agreement between anti-CD34 and BNH9 monoclonal antibodies is better for determining microvessel density. There is a higher level of angiogenic activity in squamous cell carcinomas, undifferentiated carcinomas and squamous cell carcinomas with lymph node involvement.

1. INTRODUÇÃO

A angiogênese é o desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos preexistentes, podendo ocorrer nas neoplasias, processos inflamatórios e reações imunes. Em neoplasias, a angiogênese é essencial para o crescimento e a progressão dos tumores, pois a proliferação e a sobrevivência das células neoplásicas são dependentes do equilíbrio entre os fatores de crescimento e moléculas tóxicas que devem ser removidas. Em tumores sólidos, o oxigênio pode difundir-se radialmente a partir do capilar por somente 150 a 200 μm (TOM *et al.*, 1995).

Os novos capilares formados nas neoplasias são estruturalmente semelhantes aos capilares formados durante a neovascularização fisiológica. Originam-se a partir de capilares, vênulas, raramente de arteríolas e jamais de veias e artérias (WARREN, *et al.*, 1972).

O processo da angiogênese tem sido estudado nas últimas cinco décadas, porém com metodologia mais precisa nos últimos anos. COMAN, SHELDON (1946) observaram que tumores implantados no tecido celular subcutâneo de ratos apresentavam uma hiperemia intensa em torno do implante tumoral. A hiperemia ocorria dentro de 18 horas após o implante, e cerca de 24 a 36 horas surgia uma zona avermelhada de 1 a 3 milímetros envolvendo a área do implante. Esta zona de hiperemia consistia de pequenos

capilares, os quais formavam uma densa rede de canais interligados. As alterações vasculares no tecido adjacente ao implante tumoral ocorriam aparentemente antes da neovascularização e do crescimento dos vasos dentro e em torno do tumor. Observaram também que o implante de tecido adulto normal não induzia à hiperemia.

A maioria dos tumores humanos persiste *in situ* por meses ou anos sem neovascularização, mas tornam-se vascularizados quando se inicia o fenômeno angiogênico. Na fase pré-vascular, o tumor raramente é maior que 2 a 3 milímetros cúbicos e pode conter milhões de células. Estas lesões são geralmente assintomáticas, no entanto, lesões visíveis na pele e no colo do útero podem ser detectadas nesta fase (FOLKMAN, 1995a).

Em outros relatos se afirma que um tumor com 10^6 células não conseguirá expandir sua população celular a menos que ocorra neoformação vascular, fato que aumenta também a possibilidade de células tumorais ganharem a corrente sanguínea (LIOTTA *et al.*, 1974).

As células de tumores pré-vasculares ou de micrometástases podem replicar-se tão rapidamente quanto à de tumores vascularizados, mas sem o crescimento de novos vasos, a taxa de proliferação equilibra-se com a taxa de morte das mesmas (FOLKMAN, 1995b; HOLMGREN, *et al.*, 1995). A maioria dos tumores torna-se sintomática e clinicamente detectável somente após a neovascularização. Entretanto, os fenômenos angiogênicos nem sempre resultam em proliferação rápida do tumor. Alguns tumores, como os adenomas de adrenal, não apresentam crescimento correspondente à sua alta atividade angiogênica (FOLKMAN, 1995a).

O primeiro relato da relação entre angiogênese e a probabilidade de metástase foi em melanoma (SRIVASTAVA *et al.*, 1988). É possível que o alto risco de metástase nos tumores com alta densidade de microvasos deva-se ao aumento da superfície da área vascular, facilitando o escape de células tumorais para dentro da circulação (FOLKMAN, 1995a)

A angiogênese é um processo complexo que envolve uma alteração no equilíbrio local entre os fatores positivos e negativos que regulam o crescimento de microvasos. A célula tumoral pode, expressar um ou mais fatores positivos reguladores da angiogênese, mobilizar proteína angiogênica da matriz extracelular, recrutar macrófagos que produzem suas próprias proteínas angiogênicas ou combinação destes processos (FOLKMAN 1995a).

O processo da angiogênese pode ser teoricamente dividido em quatro fases: ativação, proliferação e migração das células endoteliais e, por último, a formação do lúmen do novo vaso (SOLIMENE *et al.*, 2001).

A ativação das células endoteliais é a primeira fase da angiogênese e inicia-se pela inibição do gene supressor de tumor e ativação do oncogene. Este mecanismo foi sugerido com base num estudo em pacientes com câncer de pulmão, em que a inibição do gene supressor de tumor p53 associou-se à angiogênese (YUAN *et al.*, 2002). A hipóxia e a acidose no ambiente microtumoral estimulariam a expressão de fatores de crescimento das células endoteliais e de seus receptores, sendo que as citocinas e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) seriam fundamentais nesta fase da angiogênese.

A segunda fase é a proliferação das células endoteliais, que é controlada por mecanismos autócrinos e da expressão de moléculas que medeiam as interações entre as células endoteliais neoformadas e seu microambiente (SOLIMENE *et al.*, 2001).

A terceira fase é a migração das células endoteliais, que ocorre após a degradação da matriz extracelular e da fibrinólise (McNAMARA *et al.*, 1998). Receptores $\alpha_5\beta_3$ medeiam a migração das células endoteliais por meio da interação com componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina.

A última fase da angiogênese é a formação do lúmen do novo vaso, que é determinada pela migração das células endoteliais tipo I e II em direção ao tumor, ao mesmo tempo em que são induzidas a se dividir. A primeira a migrar é a célula endotelial tipo II porque possui motilidade superior à do tipo I. Além disso, esta célula é capaz de secretar fibronectina ao longo do seu trajeto em direção ao tumor, glicoproteína esta que facilita a angiogênese e demarca o caminho a ser seguido pela célula endotelial tipo I, a qual terá como função o revestimento do vaso em formação (HANNAN, McAUSLAN, 1982; NICOSIA, *et al.*, 1993).

O primeiro fator angiogênico tumoral foi isolado no início da década de 70, por FOLKMAN (1971) a partir de extratos de sarcoma mamário de Walker, composto por RNA, proteínas e carboidratos, constituindo-se, assim, em um preparado não-purificado que foi inicialmente chamado de fator angiogênico tumoral (TAF).

A partir de então, vários fatores angiogênicos têm sido identificados. Dos 20 fatores angiogênicos conhecidos até o momento, aqueles mais freqüentemente encontrados

em neoplasias malignas são o fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou fator de permeabilidade vascular (HARRIS, 1997).

Já os fatores inibidores da angiogênese são os que defendem o endotélio do estímulo mitogênico e podem ser: sintéticos e semi-sintéticos (carboxiamidotriazol, CM 101, marimostat, pentosan, talidomida e TNP-470); inibidores endógenos (angiopoitina 2, angiostatina, endostatina, IL -12, interferon- α e fator plaquetário 4); antagonistas biológicos (antagonista das integrinas α -vB3, bloqueadores dos receptores VEGF, inibidores do VEGF e receptores solúveis); antagonistas vasculares (anticorpos direcionados, terapia gênica vascular e TNF- α regional) (AUGUSTIN, 1998).

A principal metodologia empregada na quantificação da angiogênese em neoplasia é a determinação da densidade de microvasos por meio de imunoistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais como marcadores da angiogênese (ABULAFIA, *et al.*, 1996; BREMER *et al.*, 1996; KAKU *et al.*, 1998; LENCZEWSKI *et al.*, 2001; BENITEZ-BRIBIESCA *et al.*, 2001).

Como a angiogênese está muito envolvida no crescimento tumoral, é admissível considerar que a sua caracterização e quantificação possa ter aplicações clínicas em oncologia, principalmente como fator prognóstico (FOLKMAN, 1995a). A angiogênese parece estar associada com o prognóstico de vários cânceres, avaliada com o risco de metástase, sobrevida livre e sobrevida total (WEIDNER *et al.*, 1991; WEIDNER *et al.*, 1992; Van HOEF *et al.*, 1993 ; TJALMA *et al.*, 1998; AGUAYO *et al.*, 2002; DELMOTTE *et al.*, 2002; GALLO *et al.*, 2002).

Neste sentido, vários autores têm pesquisado a associação da angiogênese com o prognóstico em diferentes tumores e há estudos clínicos sobre terapia antiangiogênica em vários tumores sólidos (National Cancer Institute, 2002).

A atividade angiogênica em doenças neoplásicas ou não-neoplásicas também pode ser medida indiretamente pela quantificação de proteínas angiogênicas em líquidos orgânicos (FOLKMAN, 1995b). Assim, altas concentrações de bFGF foram encontradas no plasma de aproximadamente 10% dos pacientes com câncer (FOLKMAN, 1995b) e na urina de mais de 37% destas pacientes (NGUYEN, *et al.*, 1994).

LI *et al.* (1994) também encontraram alta concentração de bFGF biologicamente ativo no líquido de crianças com tumores cerebrais, comparadas com crianças com hidrocefalia ou câncer fora do sistema nervoso central. A concentração de bFGF no líquido correlacionou-se com a densidade de microvasos no exame histológico e como indicador de risco de óbito.

Relativamente a outras neoplasias, não existem muitos estudos sobre a angiogênese no carcinoma do colo uterino. SMITH-MCCUNE, WEIDNER (1994) estudaram pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), utilizando antígeno relacionado ao fator VIII, e encontraram maior atividade angiogênica em pacientes com NIC II e III, em relação aos controles, e com NIC III, em relação à NIC I.

GUIDI *et al.* (1995), utilizando hibridização *in situ* para pesquisar a expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular por meio do RNAm (VEGF RNAm) e antígeno relacionado ao fator VIII, observaram que o VEGF RNAm e o número de microvasos

foram significativamente maiores nas NIC de alto grau e carcinoma invasivo em relação às lesões benignas e NIC de baixo grau. Observaram também que um aumento no número de microvasos foi associado significativamente com o aumento de VEGF RNAm.

Neste mesmo sentido, LEUNG, *et al.*, (1994) relataram que a presença de antígeno relacionado ao fator VIII, determinado por imunoistoquímica, foi significativamente maior nas neoplasias cervicais invasivas em relação às pacientes com NIC III.

ABULAFIA *et al.* (1996) estudaram a angiogênese no colo uterino de pacientes tratadas por doença benigna, carcinoma *in situ* e carcinoma epidermóide microinvasivo, utilizando o antígeno relacionado ao fator VIII, e observaram uma contagem de microvasos superior no carcinoma microinvasivo em relação ao controle e ao carcinoma *in situ*.

Utilizando também a determinação imunoistoquímica do antígeno relacionado ao fator VIII para avaliação da angiogênese em pacientes com carcinoma cervical, estádios Ib a IVa da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, SCHLENGER *et al.* (1995) observaram que as pacientes com maior vascularização tiveram uma sobrevida global e livre de doença menor em relação às pacientes com menor vascularização do tumor.

Já DELLAS *et al.* (1996) estudaram angiogênese em espécimes cervicais (colo normal, NIC de baixo grau, NIC de alto grau e carcinomas invasivos). Por meio da imunoistoquímica e utilizando anticorpo contra o antígeno CD31, observaram que a densidade de microvasos, *status* linfonodal pélvico e invasão vascular foram indicadores prognósticos independentes da sobrevida em pacientes com estágio IB.

DAVIDSON, *et al.*, (1997) estudaram a angiogênese em colo uterino normal, neoplasia intra-epitelial e carcinoma invasivo, utilizando fator de von-Willebrand e Ulex Europaeus Lectin. Os autores encontraram um aumento da contagem de microvasos, à medida que a neoplasia progredia.

OBERMAIR *et al.* (1998) correlacionaram a densidade de microvasos no tumor por meio do antígeno relacionado ao factor VIII com a sobrevida global em 166 pacientes com estágio Ib de câncer do colo do útero. Em uma análise multivariada, a densidade de microvasos, envolvimento dos linfonodos pélvicos, tamanho do tumor e aplicação de radioterapia permaneceram como fatores prognósticos de sobrevida, enquanto o envolvimento do espaço linfático não teve significado.

DAVIDSON *et al.* (1999), utilizando a determinação imunoistoquímica da angiogênese por intermédio do marcador endotelial CD31 e Ulex Europaeus Lectin I (UEA I) e o marcador específico de macrófago CD 68 em espécime de carcinoma cervical, mostraram que a UEA I e o CD31 estavam significativamente mais altos nos estádios IB e II do que nos estádios III-IV. Nenhuma associação foi observada com a idade, grau de diferenciação e sobrevida.

WIGGINS *et al.* (1995) analisaram, por meio de estudo imunoistoquímico, o antígeno relacionado ao fator VIII em espécimes de cone ou de histerectomia de pacientes com carcinoma cervical, comparando-os com controles normais. Os autores observaram que o número de microvasos foi significativamente maior nos casos com carcinomas em relação aos controles. Nenhuma associação foi observada entre a angiogênese e o *status* linfonodal, envolvimento parametrial, profundidade de invasão ou doença macroscópica.

Contudo, a contagem de microvasos correlacionou-se com o envolvimento do espaço vascular.

RUTGERS, *et al.*, (1995) não encontraram relação entre a angiogênese e o prognóstico em pacientes com carcinoma do colo uterino em estádios Ib a IV. Os autores estudaram 70 pacientes com carcinoma espinocelular por meio de imunoistoquímica, utilizando o antifator VIII para a determinação da densidade de microvasos e não encontraram associação significativa entre a média de vasos e o estágio da doença.

Resultados semelhantes foram encontrados por KAINZ *et al.* (1995) que, usando fator VIII, compararam pacientes com estágio Ib e IIb e também não encontraram associação entre angiogênese e o estágio do tumor.

DINH *et al.* (1996) estudaram a angiogênese em 22 pacientes pela imunoistoquímica para o antígeno relacionado ao fator VIII. A presença de alta contagem de microvasos e tamanho do tumor foram fatores independentes em prever recidiva, não apresentando importância prognóstica a idade, grau de diferenciação, invasão vascular linfática e tipo de tratamento realizado.

Di LEO *et al.* (1998), utilizando imunoistoquímica com os anticorpos monoclonais contra o antígeno relacionado ao fator VIII, CD 31 e vimentina, estudaram a angiogênese em pacientes com recidiva de câncer do colo uterino após cirurgia radical e não encontraram associação entre a contagem de microvasos em relação ao status linfonodal, profundidade de invasão e diferenciação histológica. Todavia, encontraram associação entre a invasão vascular linfática e o maior número de vasos neoformados.

TJALMA *et al.* (1998) estudaram a neovascularização estromal em 114 carcinomas invasivos do colo uterino e em 20 *in situ* com o marcador endotelial CD31 e não encontraram associação significativa entre a contagem de vasos com o tipo histológico do tumor, grau de diferenciação, estágio clínico, presença de metástase linfonodal e envolvimento do espaço linfo-vascular.

Resumindo, como pode ser observado pelos estudos já citados, vários anticorpos monoclonais têm sido utilizados na quantificação da densidade de microvasos em câncer do colo uterino. Com base nos resultados mais convergentes, pode-se concluir que a atividade angiogênica aumenta progressivamente a partir do tecido normal do colo uterino, passando pelas lesões de baixo e alto graus, até carcinoma invasivo, porém não parece variar com o estágio clínico da doença invasiva. Predomina também a demonstração de que maior atividade angiogênica está associada com pior prognóstico, à semelhança do que ocorre com outros neoplasias malignas.

Dentre os antígenos mais utilizados para estudar a angiogênese, o CD31 é também chamado de molécula de adesão celular plaqueta-endotélio (PECAM-1). Trata-se de uma glicoproteína, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, que está presente nas células endoteliais e numa variedade de células hematopoiéticas, incluindo plaquetas, linfócitos e células plasmáticas (MIETTINEN, *et al.*, 1994).

O CD34 é um antígeno que também é uma glicoproteína que está presente em células progenitoras hematopoiéticas e células endoteliais e tem sido estudado como marcador de tumores vasculares (TRAWEEK *et al.* 1991; KUZU *et al.* 1992). Parece ser

um marcador muito sensível da diferenciação das células endoteliais, corando mais fortemente o endotélio neoplásico do que o endotélio normal (MURO-CACHO, 2002)

A utilização do CD34 como marcador de células endoteliais em neoplasias hematopoiéticas tem se mostrado superior aos outros anticorpos monoclonais disponíveis. Todavia, o estudo da angiogênese com anti-CD34 em neoplasias do trato genital feminino ainda é limitado, tendo sido utilizado em câncer de ovário e carcinosarcomas (HEIMBURG *et al.* 1997; HEIMBURG *et al.*, 1999; COSTA, GUINEE, 2000).

Após procura minuciosa nos bancos de dados científicos foram encontrados apenas três estudos avaliando o anti-CD34 em neoplasia do colo uterino. CALUX *et al.* (2001) encontraram maior número de microvasos com o anti-CD34 em relação ao antifator VIII. Todavia, os autores não avaliaram a associação da densidade de microvasos com características anatomopatológicas do carcinoma nem com sobrevida.

Por sua vez, HIRAKAWA *et al.* (1999), num estudo retrospectivo, analisaram a presença de microvasos em pacientes com carcinoma cervical, utilizando o anti-CD 34, e encontraram associação com a sobrevida total, porém, não foi observada associação com estágio e invasão estromal.

CHENG *et al.* (1999), num estudo para avaliar a aplicabilidade do dopplervelocimetria para avaliar a angiogênese *in vivo*, também estudaram a densidade de microvasos em câncer do colo uterino utilizando o anti-CD34 e encontraram associação da densidade de microvasos com a profundidade de invasão estromal e tamanho do tumor.

O conhecimento ainda é mais escasso com BNH9, pois não se encontrou nenhum estudo relacionando-o com a angiogênese do carcinoma do colo uterino. O BNH9 é um anticorpo que reage com antígenos H e Y, integrantes dos antígenos dos grupos sanguíneos H e Y, que são estruturas carboidratadas ligadas a glicoproteínas e glicolipídeos de membranas celulares. Estes antígenos foram inicialmente descritos em eritrócitos, porém podem também ser encontrados em células normais e malignas. Ligam-se fortemente a células de linfoma de células grandes anaplásticas, e as células endoteliais expressam o antígeno H. Uma das características do BNH9 é a boa reatividade em material parafinado (DELSOL *et al.*, 1991).

Tendo em vista o conhecimento ainda relativamente restrito sobre a angiogênese no carcinoma do colo uterino e resultados pouco convergentes referentes a suas características anatomopatológicas do carcinoma invasivo, foi proposta a realização deste estudo. Para tal, casos cirúrgicos foram selecionados por disporem de informações anatomopatológicas mais detalhadas.

Os marcadores de células endoteliais selecionados para este estudo foram o CD34 e BNH9, pois ainda é restrito o conhecimento sobre a associação com as características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino. Incluiu-se também o CD31, com objetivo de tê-lo como elo dos resultados deste estudo com o conhecimento existente na literatura.

Admite-se que se existir associação entre características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino e a angiogênese, analisada com a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD34, anti-CD31 e anti-BNH9, aumentaria o interesse em estudar estes marcadores como fator prognóstico para o carcinoma invasivo do colo uterino, como também para outras neoplasias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a associação entre a angiogênese e as características anatomopatológicas no carcinoma do colo uterino, por meio da densidade de microvasos determinada pela técnica de imunistoquímica com os anticorpos monoclonais anti-CD34, anti-CD31 e BNH9.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a densidade de microvasos identificada pelos anticorpos monoclonais anti-CD34, anti-CD31 e BNH9 para o carcinoma do colo uterino.
- Comparar a concordância dos anticorpos monoclonais anti-CD34, anti-CD31 e BNH9 para determinar a densidade de microvasos.
- Analisar a associação da densidade de microvasos com tipo histológico e grau de diferenciação histológica, diâmetro tumoral, invasão em profundidade do estroma, invasão vascular, invasão linfática, invasão perineural e comprometimento linfonodal, para cada anticorpo monoclonal utilizado.

3.SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Este estudo foi do tipo observacional analítico do tipo transversal.

3.2. Tamanho amostral e seleção dos sujeitos

Foram incluídas 62 mulheres admitidas consecutivamente no Hospital São Marcos de Teresina, Estado do Piauí, entre janeiro de 2000 e fevereiro de 2002, com diagnóstico de carcinoma invasivo do colo do útero nos estádios Ib e IIa e que atenderam aos demais quesitos deste estudo.

3.2.1. Critérios de inclusão

Foram incluídas as mulheres com diagnóstico de carcinoma invasivo do colo uterino, estádios Ib1 , Ib2 e IIa da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria, e que foram submetidas a histerectomia radical e linfadenectomia pélvica bilateral.

3.2.2. Critérios de exclusão

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão:

- pacientes submetidas a quimioterapia e/ou radioterapia prévia ao tratamento cirúrgico;
- neoplasia maligna prévia ou sincrônica;
- sem tumor residual na peça operatória;
- diagnóstico histológico final da peça operatória foi carcinoma microinvasor ou carcinoma *in situ*.

3.3. Variáveis e conceitos

3.3.1. Variáveis independentes

Foram consideradas como variáveis independentes as características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino.

I. Tipo histológico

- Carcinoma escamoso – neoplasia de células epiteliais com diferenciação escamosa. Adenocarcinoma – neoplasia de células epiteliais com diferenciação glandular

II. *Grau de diferenciação histológica*

- Grau I – tumor bem diferenciado

- Grau II – tumor moderadamente diferenciado

- Grau III – tumor indiferenciado

A análise da associação entre variáveis numa amostra de 62 pacientes é exequível para variáveis dicotômicas. Portanto, o grau de diferenciação foi analisado apenas com duas categorias. Optou-se por analisar em conjunto as categorias GI e GII por distribuir os casos mais uniformemente do que se fossem agrupadas GII e GIII.

III. *Maior diâmetro tumoral: maior diâmetro do tumor medido em milímetros, com base no laudo do exame anatomopatológico da peça operatória.*

IV. *Invasão em profundidade: invasão do estroma a partir da membrana basal, medida em milímetros no exame anatomopatológico.*

V. *Invasão linfática: presença de grupo de células neoplásicas dentro de vaso linfático. Foi analisada como variável dicotômica, categorizada como ausente ou presente.*

VI. *Invasão vascular: presença de grupo de células neoplásicas dentro de capilar. Foi analisada como variável dicotômica, categorizada como ausente ou presente.*

VII. *Invasão perineural: presença de grupo de células neoplásicas dentro da bainha do filete nervoso. Foi analisada como variável dicotômica, categorizada como ausente ou presente.*

VIII. *Número total de linfonodos dissecados: somatório dos linfonodos de todas as cadeias linfáticas pélvicas, identificados no exame anatomopatológico.*

IX. *Número de linfonodos comprometidos: número de linfonodos com presença de células neoplásicas no seu parênquima.*

3.3.2. Variáveis dependentes

Foram consideradas variáveis dependentes as densidades de microvasos ou médias de microvasos obtidas a partir da interpretação imunoistoquímica para os anticorpos monoclonais anti-CD34, anti-CD31 e BNH9. A densidade de microvaso foi calculada pela contagem de dez campos em grande aumento (400X) dividido por dez.

Para as análises em que a densidade de microvasos foi dicotomizada, adotou-se como ponto de corte a mediana da densidade para cada anticorpo monoclonal e para aquela amostra. Portanto, o ponto de corte variou com o anticorpo e com a amostra, como ocorreu quando analisaram todos os casos de carcinoma em relação a quando analisaram apenas os carcinomas escamosos.

3.3.3. Variável de controle

I. *Idade: idade da mulher, calculada em anos completos, desde a data do nascimento até a data do diagnóstico da neoplasia.*

3.4. Técnica e exames

3.4.1. Técnica operatória

Todas as pacientes foram submetidas a histerectomia radical e linfadenectomia pélvica bilateral, com ou sem anexectomia bilateral. A dissecação linfática foi realizada das cadeias obturadoras, ilíacas internas e ilíacas externas.

3.4.2. Seleção do material biológico

Foram identificados os números das lâminas e dos blocos de parafina correspondentes às mulheres selecionadas para o estudo. Este material foi localizado no arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Marcos e todas as lâminas foram revisadas pela mesma patologista para confirmação do diagnóstico de carcinoma cervical invasivo e dos parâmetros anatomopatológicos.

3.4.3. Processamento laboratorial

Todos os blocos de parafina contendo material do colo uterino, que haviam sido fixados em formol a 10%, foram processados no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism) da Unicamp.

3.4.4. Cortes histológicos

Dos blocos selecionados foram realizados cortes de 4 µm de espessura e foram colocadas em lâminas previamente silanizadas (solução de organossilano (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma, cód A 3648) a 4% em acetona. Após este tratamento, as lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 110° C durante uma hora para fixação dos mesmos nas lâminas. Em seguida, foram retiradas e mantidas à temperatura ambiente por uma hora até o momento da reação.

3.4.5. Técnica da imunistoquímica

Foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para o antígeno CD34 (Anti-Human Haematopoietic Progenitor Cell, CD34 Class II, Clone QBEnd 10, Code M 7165, DAKO Corporation, Dakopatts, Carpinteria, USA) na diluição de 1:25 com soroalbumina bovina (BSA), CD31 (Anti-Human Endothelial Cell, Clone JC/70A, DAKO Corporation Dakopatts, Carpinteria, USA) na diluição 1:30 e o BNH9 na diluição 1:20, gentilmente cedido pelo professor George Delsol, Toulouse - França.

Os cortes foram desparafinados em banho de xilol a 110° C e, a seguir banhos subseqüentes em xilol à temperatura ambiente. Após este processo, os cortes foram hidratados em álcool etílico nas concentrações decrescentes 100%, 80% e 50% e lavados em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em três banhos de H₂O₂ a 10 volumes cada um, com duração de três minutos, seguidos de lavagem em PBS (solução salina tamponada com fostato, pH 7,4 a 7,6). Para recuperação antigênica

foi utilizada panela a vapor T-fall, com objetivo de desmascarar antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, pH 6,0 (10mM) durante 30 minutos a 95° C e, após 20 minutos (tempo para resfriamento) lavadas em água corrente e colocadas em tampão PBS). Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo primário específico “overnigth” a 4° C.

Após a incubação, as lâminas foram passadas por três lavagens em PBS sob agitação, secadas e incubadas com “EnVision™ System (DAKO, cód K1491)” durante uma hora a 37° C, e a seguir, três lavagens em PBS com agitação. A revelação foi realizada com substrato cromógeno, DAB (3-3’diaminobenzidina, SIGMA, código D5637) na proporção 0,06 g para 100 ml de PBS, 500µl H₂O₂ a 30 volumes e 1 ml DMSO, durante 5 minutos a 37° C. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e contracolorados com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool 100% e xilol, a seguir montadas com lamínulas e resina Entellan (MERCK Cod.1.07961.0100). Como controle positivo, foram usados tecidos de hemangioma hepático.

3.4.6. Quantificação da angiogênese

A contagem dos microvasos foi realizada sem o conhecimento dos parâmetros anatomopatológicos das pacientes. Utilizou-se um microscópio Nikon Eclipse E200 para contagem dos vasos, sem auxílio de qualquer dispositivo. Inicialmente, localizou-se as áreas de maior concentração de microvasos com aumento 40 X (objetiva de 4 e ocular de

10). Nestas áreas de maior concentração de microvasos foi feita a contagem dos microvasos em dez campos de grande aumento, com objetiva de 40X e lente ocular de 10X lâmina.

Foram considerados como unidade vascular, segundo o critério de Weidner (1991, 1992), qualquer célula ou grupo de células endoteliais com coloração castanha que estivessem claramente separadas de microvasos adjacentes, células tumorais e outros tecidos conjuntivos. O lúmen vascular, embora usualmente presente, não foi um critério para definir microvaso, e a presença de hemácia não foi critério para definir a presença de luz do vaso. Os vasos parcialmente caracterizados ou não contidos por inteiro nos campos analisados não foram considerados na contagem.

Estabeleceu-se que o número total de vasos, obtidos em cada caso, seria o resultado do somatório do número de vasos contados em cada um dos dez campos histológicos avaliados e a densidade de microvasos a média dos dez campos.



Figura 1: microvaso (seta) - aumento de 400X

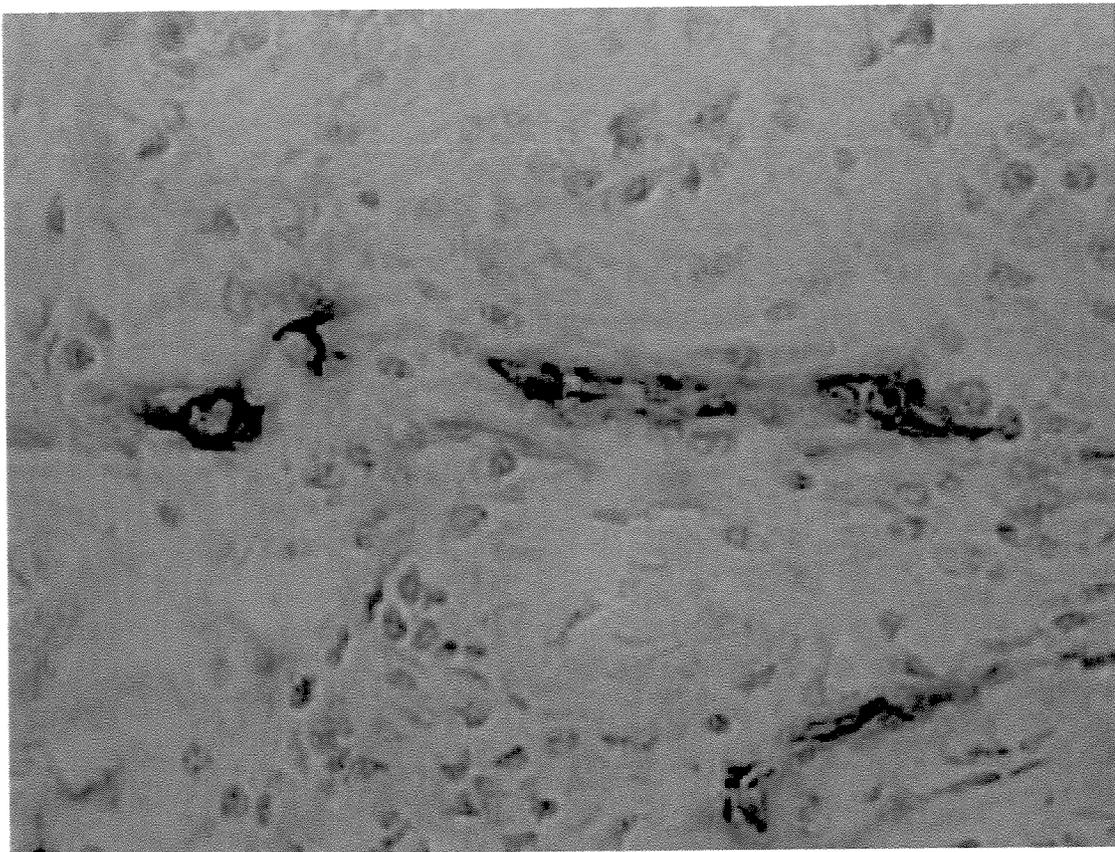


Figura 2: microvaso corte longitudinal (seta)

3.5. Coleta dos dados

A coleta dos dados foi realizada por meio do preenchimento de uma ficha criada para este estudo (ANEXO 1). Para cada caso foi atribuído um número seqüencial para identificação.

Os dados clínicos foram obtidos do prontuário médico das pacientes no Hospital São Marcos. As características anatomopatológicas dos espécimes dos carcinomas das mulheres e os dados referentes a identificação e contagem dos microvasos pela técnica imunohistoquímica foram anotados diretamente pela médica patologista responsável pela interpretação dos respectivos exames.

3.6. Processamento e análise dos dados

Os dados transcritos na ficha foram revisados manualmente para detecção de possíveis erros de seleção e preenchimento. Foi criado um banco de dados, utilizando o programa Excel, com as variáveis do estudo. A digitação do banco foi feita com conferência manual a partir da listagem dos dados. A revisão da consistência dos dados foi feita com base nas tabelas descritivas.

Em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa *SAS* versão 8.2 (CARY, 1989) para realização da análise dos dados propriamente dita.

As densidades de microvasos foram comparadas utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor foi menor ou igual a 0,05. As taxas de concordância entre os anticorpos com base na densidade de microvasos foram estimadas pelo coeficiente *kappa* (LANDIS & KOCH, 1977) com seu respectivo intervalo de confiança de 95%. O coeficiente *kapa* foi classificado como concordância péssima quando menor que zero; ruim de 0 a 0,2; razoável de 0,2 a 0,4; boa de 0,4 a 0,6; muito boa de 0,6 a 0,8; e excelente de 0,8 a 1,0 (LANDIS & KOCH, 1977). Para analisar a concordância entre os anticorpos monoclonais, as respectivas densidades de microvasos foram analisadas como variáveis dicotômicas, tendo como ponto de corte a mediana.

A análise da associação de cada variável referente às características anatomopatológicas com a densidade de microvasos foi realizada por meio de *odds ratios* – que estima a magnitude da associação entre as variáveis – e seus respectivos intervalos de confiança de 95% – que dá informação sobre a significância estatística – (análise univariada). Para tal, foi necessário analisar a densidade de microvasos como variável dicotômica, tendo sido adotado como ponto de corte a mediana (ALTMAN, 1991).

3.7. Aspectos éticos

O estudo foi retrospectivo e realizado a partir dos blocos de parafina contendo material de peças cirúrgicas das mulheres. Este blocos estavam arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Marcos. Nenhuma mulher foi identificada pelo nome, mas sim pelos números do prontuário, biópsia ou do caso no estudo. A conduta clínica permaneceu inalterada e, portanto, não houve riscos nem benefícios diretos para as mulheres incluídas neste estudo.

Entendeu-se que não foi necessário o Termo de Consentimento porque os dados foram colhidos após o atendimento da paciente, nenhum dos pesquisadores teve contato direto com as mulheres, não houve qualquer alteração na rotina assistencial, e as variáveis foram colhidas de prontuários e análise de material armazenado em blocos de parafina provenientes de cirurgias prévias.

Os dados obtidos foram utilizados de maneira confidencial, obedecendo aos preceitos do Código de Ética Médica para utilização científica de dados de pacientes e respeitados os princípios da DECLARAÇÃO DE HELSINQUE II (2000) e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.

4. Resultados

4.1 - Caracterização da amostra

Foram incluídas no estudo 62 mulheres, admitidas no Hospital entre janeiro de 2000 e fevereiro de 2002. A média de idade foi 49,3 anos, variando de 26 a 75 anos. Oitenta e dois por cento dos casos estavam no estágio clínico Ib1 e apenas uma paciente era IIa. A média de linfonodos retirados foi 14,7, variando de 2 a 33 linfonodos (Tabela 1).

Tabela 1. Características gerais das pacientes incluídas no estudo

Idade (anos)	Média (DP)	49,3 (11,4)	
	Mínima	26	
	Máxima	75	
Número de linfonodos retirados	Média (DP)	14,7 (5,9)	
	Mínimo	2	
	Máximo	33	
Estádio clínico		n	%
	Ib1	51	82
	Ib2	10	16
	IIa	1	2

DP = Desvio padrão

Oitenta e sete por cento dos carcinomas eram do tipo histológico escamoso, 44% dos casos eram do grau histológico III e 21% apresentaram linfonodos comprometidos. A invasão linfática foi diagnosticada em 40% dos casos, enquanto a invasão sanguínea e a invasão perineural foram diagnosticadas, respectivamente, em 24% e 19% dos casos. A média dos maiores diâmetros tumoral foi 31,8 milímetros, variando entre 10 e 65 milímetros. A média da invasão em profundidade a partir da membrana basal foi 15,8 milímetros, variando entre 3 e 30 milímetros (Tabela 2).

Tabela 2. Características anatomopatológicas da amostra de estudo

		n	%
Tipo histológico	Carcinoma escamoso	54	87
	Adenocarcinoma	8	13
Grau histológico	G I	6	9,8
	G II	28	45,2
	G III	27	44
	Ignorado	1	-
Invasão sanguínea	Ausente	47	76
	Presente	15	24
Invasão linfática	Ausente	37	60
	Presente	25	40
Invasão perineural	Ausente	50	81
	Presente	12	19
Número de linfonodos comprometidos	0	49	79
	1	5	8
	2	4	7
	3	2	3
	4	1	2
	5	1	2
Maior diâmetro tumoral (mm)	Média	31,8	
	Mínimo	10	
	Máximo	65	
Invasão em profundidade (mm)	Média	15,8	
	Mínimo	3	
	Máximo	30	

4.2. Caracterização das análises imunoistoquímicas

Todos os casos apresentaram resultados positivos para CD34, enquanto quatro e 17 casos foram negativos, respectivamente, para BNH9 e CD31. A densidade de microvasos foi de 100, 89 e 52, respectivamente, para anti-CD34, BNH9 e anti-CD31. De acordo com o Teste de Kruskal-Wallis, as densidades de microvasos estimadas pelos anti-CD34 e pelo BNH9 foram significativamente maiores que a densidade estimada pelo anti-CD31. A diferença entre as densidades estimadas pelo anti-CD34 e pelo BNH9 não foi estatisticamente significativa (Tabela 3).

Agrupando a densidade de microvasos por campo em categorias, de acordo com a mediana, 54 casos de 62 apresentaram concordância diagnóstica para os anticorpos monoclonais anti-CD34 e BNH9, sendo que o coeficiente de *kappa* foi de 0,74 (concordância muito boa). Os quatro casos que apresentaram BNH9 negativo foram incluídos na categoria com menos de 9,5 microvasos por campo (Tabela 4). Considerando apenas os oito casos com adenocarcinoma, o coeficiente de *Kappa* foi de 0,60, ou seja, concordância boa (Tabela 5).

Tabela 3. Características gerais das análises imunoistoquímicas

Anti-CD 34	n
Casos negativos	0
Casos positivos	62
Média total de microvasos	100
Valor mínimo do total de microvasos	48
Valor máximo do total de microvasos	200
BNH9	
Casos negativos	4
Casos positivos	58
Média total de microvasos	89
Média do total de microvasos (excluídos os casos negativos)	97
Valor mínimo do total de microvasos (excluídos os casos negativos)	22
Valor máximo do total de microvasos	185
Anti-CD31	
Casos negativos	17
Casos positivos	45
Média total de microvasos	52
Média do total de microvasos (excluídos os casos negativos)	72
Valor mínimo do total de microvasos (excluídos os casos negativos)	16
Valor máximo do total de microvasos	139
Densidade de microvasos:	Teste de Kruskal-Wallis
CD34 x BNH9 x CD31:	p < 0,01
CD34 x BNH9	p = 0,85
BNH9 x CD31:	p < 0,01
CD34 x CD31	p < 0,01

Tabela 4. Concordância entre os anticorpos anti-CD34 e BNH9 para estimar a densidade de microvasos

Anti-CD 34	BNH 9		Total
	até 9,5	9,6 ou +	
até 9,6	27	4	31
9,7 ou +	4	27	31
Total	31	31	62

Coefficiente de kappa = 0,74 (0,56 a 0,91)

Tabela 5. Concordância entre os anticorpos anti-CD34 e BNH9 para estimar a densidade de microvasos somente para os casos de adenocarcinoma

Anti-CD 34	BNH 9		Total
	até 9,5	9,6 ou +	
até 9,6	6	1	7
9,7 ou +	0	1	1
Total	6	2	8

Coefficiente de kappa = 0,60 (-0,07 a 1,00)

Adotando o agrupamento da densidade de microvasos com o anti-CD31 em até 6,0 e 6,1 ou mais e para o anti-CD34 em até 9,6 e mais que 9,6 a concordância ocorreu em 42 casos, com coeficiente de *kappa* de 0,35 (concordância razoável) (Tabela 6).

De forma semelhante, 40 casos dos 62 apresentaram concordância diagnóstica para os anticorpos monoclonais CD31 e BNH9, com coeficiente de *Kappa* de 0,29 (concordância razoável) (Tabela 7). Os quatro casos que apresentaram BNH9 negativo e os

17 casos CD31 negativo foram incluídos na categoria com até 9,5 e até 6,0 microvasos por campo, respectivamente.

Tabela 6. Concordância entre os anticorpos anti-CD34 e anti-CD31 para estimar a densidade de microvasos

Anti-CD 34	Anti-CD 31		Total
	até 6,0	6,1 ou +	
até 9,6	21	10	31
9,7 ou +	10	21	31
Total	31	31	62

Coefficiente de kappa 0,35 (0,12 a 0,59)

Tabela 7. Concordância entre os anticorpos anti-CD31 e BNH9 para estimar a densidade de microvasos

Anti-CD 31	BNH 9		Total
	até 9,5	9,6 ou +	
até 6,0	20	11	31
6,1 ou +	11	20	31
Total	31	31	62

Coefficiente de kappa 0,29 (0,05 a 0,53)

4.3. Associação dos marcadores de angiogênese com as características anatomopatológicas

Considerando os dados referentes ao anticorpo monoclonal anti-CD34, observou-se que dentre as mulheres que apresentaram densidade igual ou maior a 9,7 microvasos, o percentual de casos de carcinoma escamoso foi maior do que dentre as mulheres que apresentaram densidade menor, com OR de 8,8 e intervalo de confiança variando de 1,0 a 76,1 (Tabela 8).

Dentre as mulheres que apresentaram densidade igual ou maior a 9,7 microvasos, 55% tinham carcinoma escamoso grau histológico III, enquanto este percentual foi de 33%, nas mulheres com menor densidade com OR de 2,4 e intervalo de confiança variando de 0,9 a 6,7 (Tabela 8).

Ainda dentre as mulheres que apresentaram densidade igual ou maior a 9,7 microvasos, em 52% o carcinoma escamoso tinha invasão linfática, enquanto este percentual foi de 29%, nas mulheres com menor densidade com OR de 2,6 e intervalo de confiança variando de 0,9 a 7,4 (Tabela 8).

Para todas as demais variáveis analisadas em relação à densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD34, os OR foram maiores que 0,5 ou menores que 2, e os intervalos de confiança continham o valor um distante de seus limites (Tabela 8).

Tabela 8. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD34

Características	Anti-CD 34						Odds Ratio (IC95%)
	até 9,6		9,7 ou mais		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
até 49	16	52	18	58	34	55	ref
50 ou mais	15	48	13	42	28	45	0,8 (0,3 a 2,10)
Tipo histológico							
Adenocarcinoma	7	23	1	3	8	13	ref
CEC	24	77	30	97	54	87	8,8 (1,0 a 76,10)
Diâmetro tumoral							
até 29mm	11	37	13	42	24	39	ref
30mm ou +	19	63	18	58	37	61	0,8 (0,3 a 2,2)
Ignorado	1		0		1		
Grau histológico							
G I / G II	20	67	14	45	34	56	ref
G III	10	33	17	55	27	44	2,4 (0,9 a 6,7)
Ignorado	1		0		1		
Invasão sanguínea							
Ausente	23	74	24	77	47	76	ref
Presente	8	26	7	23	15	24	0,8 (0,3 a 2,7)
Invasão linfática							
Ausente	22	71	15	48	37	60	ref
Presente	9	29	16	52	25	40	2,6 (0,9 a 7,4)
Invasão perineural							
Ausente	24	77	26	84	50	81	ref
Presente	7	23	5	16	12	19	0,7 (0,2 a 2,4)
Invasão estromal							
até 9 mm	12	39	9	29	21	34	ref
10 mm ou +	19	61	22	71	41	66	1,5 (0,5 a 4,5)
Linfonodo positivo							
Não	25	81	24	78	49	79	ref
Sim	6	19	7	23	13	21	1,2 (0,4 a 4,1)

Considerando os dados referentes ao anticorpo monoclonal BNH9, observou-se que dentre as mulheres que apresentaram densidade igual ou maior a 9,6 microvasos, em 52% o carcinoma escamoso tinha invasão linfática, enquanto este percentual foi de 29%, nas mulheres com menor densidade com OR de 2,6 e intervalo de confiança variando de 0,9 a 7,4 (Tabela 9).

Para todas as demais variáveis analisadas em relação à densidade de microvasos, determinada pelo anticorpo monoclonal BNH9, os intervalos de confiança continham o valor um (Tabela 9).

Tabela 9. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal BNH9

Características	BNH9						Odds Ratio (IC95%)
	até 9,5		9,6 ou mais		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
até 49	16	52	18	58	34	55	ref
50 ou mais	15	48	13	42	28	45	0,8 (0,3 a 2,1)
Tipo histológico							
Adenocarcinoma	6	19	2	7	8	13	ref
CEC	25	81	29	94	54	87	3,5 (0,6 a 18,8)
Diâmetro tumoral							
até 29mm	12	40	12	39	24	39	ref
30mm ou +	18	60	19	61	37	61	1,1 (0,4 a 3,0)
Ignorado	1		0		1		
Grau histológico							
G I / G II	19	63	15	48	34	56	ref
G III	11	37	16	52	27	44	1,9 (0,7 a 5,0)
Ignorado	1		0		1		
Invasão sanguínea							
Ausente	23	74	24	77	47	76	ref
Presente	8	26	7	23	15	24	0,8 (0,3 a 2,7)
Invasão linfática							
Ausente	22	71	15	48	37	60	ref
Presente	9	29	16	52	25	40	2,6 (0,9 a 7,4)
Invasão perineural							
Ausente	25	81	25	81	50	81	ref
Presente	6	19	6	19	12	19	1,0 (0,3 a 3,5)
Invasão estromal							
até 9mm	12	39	9	29	21	34	ref
10mm ou +	19	61	22	71	41	66	1,5 (0,5 a 4,5)
Linfonodo positivo							
Não	27	87	22	71	49	79	ref
Sim	4	13	9	29	13	21	2,8 (0,8 a 10,2)

Considerando os dados referentes ao anticorpo monoclonal anti-CD31, observou-se que dentre as mulheres que apresentaram densidade igual ou maior a 6,1 microvasos, 60% tinham carcinoma escamoso grau histológico III, enquanto nas mulheres com menor densidade este percentual foi de 29%, com OR de 3,7 e intervalo de confiança variando de 1,3 a 11,1 (Tabela 10).

Para todas as demais variáveis analisadas em relação à densidade de microvasos, determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD31, os intervalos de confiança continham o valor um dentro de seus limites (Tabela 10).

Tabela 10. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD31

Características	Anti-CD 31						Odds Ratio (IC95%)
	até 6,0 microvasos		6,1 ou mais microvasos		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
até 49	15	48	19	61	34	55	ref
50 ou mais	16	52	12	39	28	45	0,6 (0,2 a 1,6)
Tipo histológico							
Adenocarcinoma	6	19	2	7	8	13	ref
CEC	25	81	29	94	54	87	3,5 (0,6 a 18,8)
Diâmetro tumoral							
até 29 mm	12	40	12	39	24	39	ref
30 mm ou +	18	60	19	61	37	61	1,1 (0,4 a 3,0)
Ignorado	1		0		1		
Grau histológico							
G I / G II	22	71	12	40	34	56	ref
G III	9	29	18	60	27	44	3,7 (1,3 a 11,1)
Ignorado	1		0		1		
Invasão sanguínea							
Ausente	23	74	24	77	47	76	ref
Presente	8	26	7	23	15	24	0,8 (0,3 a 2,7)
Invasão linfática							
Ausente	19	61	18	58	37	60	ref
Presente	12	39	13	42	25	40	1,1 (0,4 a 3,2)
Invasão perineural							
Ausente	24	77	26	84	50	81	ref
Presente	7	23	5	16	12	19	0,7 (0,2 a 2,4)
Invasão estromal							
até 9 mm	13	42	8	26	21	34	ref
10 mm ou +	18	58	23	74	41	66	2,1 (0,7 a 6,1)
Linfonodo positivo							
Não	23	74	26	84	49	79	ref
Sim	8	26	5	16	13	21	0,6 (0,2 a 1,9)

Considerando apenas as mulheres com carcinoma escamosos e considerando os dados referentes ao anticorpo monoclonal anti-CD34, observou-se que dentre as mulheres que apresentaram densidade igual ou maior a 10,2 microvasos, 63% tinham carcinoma escamoso grau histológico III, enquanto nas mulheres com menor densidade este percentual foi de 39%, com OR de 2,7 e intervalo de confiança variando de 0,9 a 8,3. Para todas as demais variáveis analisadas em relação à densidade de microvasos, determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD34, os OR foram maiores que 0,5 ou menores que 2, e os intervalos de confiança continham o valor um distante de seus limites (Tabela 11).

Considerando os dados referentes ao anticorpo monoclonal BNH9, observou-se que dentre as mulheres com carcinoma escamoso que apresentaram densidade igual ou maior a 10,0 microvasos, 33% tinha linfonodo positivo, enquanto que nas mulheres com menor densidade este percentual foi de 11%, com OR de 4,0 e intervalo de confiança variando de 1,0 a 17,0. Para todas as demais variáveis analisadas em relação à densidade de microvasos, determinada pelo anticorpo monoclonal BNH9, os intervalos de confiança continham o valor um dentro de seus limites (Tabela 12).

Considerando os dados referentes ao anticorpo monoclonal anti-CD31, observou-se que dentre as mulheres com carcinoma escamoso que apresentaram densidade igual ou maior a 6,5 microvasos, 65% tinham o carcinoma escamoso grau histológico III, enquanto nas mulheres com menor densidade este percentual foi de 37%, com OR de 3,2 e intervalo de confiança variando de 1,0 a 10,0. Para todas as demais variáveis analisadas em relação à densidade de microvasos, determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD31, os intervalos de confiança continham o valor um dentro de seus limites (Tabela 13).

Tabela 11. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma escamoso do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD34

Características	Anti-CD 34						Odds Ratio (IC95%)
	até 10,1 microvasos		10,2 ou mais microvasos		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
até 49	13	48	17	63	30	56	Ref
50 ou mais	14	52	10	37	24	44	0,6 (0,2 a 1,6)
Diâmetro tumoral							
até 29 mm	10	39	11	41	21	40	Ref
30 mm ou +	16	62	16	59	32	60	0,9 (0,3 a 2,7)
Ignorado	1		0		1		
Grau histológico							
G I / GII	16	62	10	37	26	49	Ref
G III	10	39	17	63	27	51	2,7 (0,9 a 8,3)
Ignorado	1		0		1		
Invasão sanguínea							
Ausente	21	78	20	74	41	76	Ref.
Presente	6	22	7	26	13	24	1,2 (0,4 a 4,3)
Invasão linfática							
Ausente	17	63	13	48	30	56	Ref.
Presente	10	37	14	52	24	44	1,8 (0,6 a 5,4)
Invasão perineural							
Ausente	21	78	22	82	43	80	Ref.
Presente	6	22	5	19	11	20	0,7 (0,8 a 3,0)
Invasão estromal							
até 9 mm	10	37	9	33	19	35	Ref.
10 mm ou +	17	63	18	67	35	65	1,2 (0,4 a 3,6)
Linfonodo positivo							
Não	22	82	20	74	42	78	Ref.
Sim	5	19	7	26	12	22	1,5 (0,4 a 5,6)

Tabela 12. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma escamoso do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal BNH9

Características	BNH9						Odds Ratio (IC95%)
	até 9,9 microvasos		10,0 ou mais microvasos		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
até 49	14	52	16	59	30	56	Ref
50 ou mais	13	48	11	41	24	44	0,7 (0,3 a 2,2)
Diâmetro tumoral							
até 29 mm	11	42	10	37	21	40	Ref
30 mm ou +	15	58	17	63	32	60,4	1,3 (0,4 a 3,8)
Ignorado	1		0		1		
Grau histológico							
Diferenciado	13	50	13	48	26	49	Ref
Indiferenciado	13	50	14	52	27	51	1,1 (0,4 a 3,1)
Ignorado	1		0		1		
Invasão sanguínea							
Ausente	20	74	21	78	41	76	Ref.
Presente	7	26	6	22	13	24	0,8 (0,2 a 2,9)
Invasão linfática							
Ausente	17	63	13	48	30	56	Ref.
Presente	10	37	14	52	24	44	1,8 (0,6 a 5,4)
Invasão perineural							
Ausente	22	82	21	78	43	80	Ref.
Presente	5	19	6	22	11	20	1,3 (0,3 a 4,8)
Invasão estromal							
até 9 mm	11	41	8	30	19	35	Ref.
10 mm ou +	16	59	19	70	35	65	1,6 (0,5 a 5,0)
Linfonodo positivo							
Não	24	89	18	67	42	78	Ref.
Sim	3	11	9	33	12	22	4,0 (1,0 a 17,0)

Tabela 13. Associação da idade da mulher e de características anatomopatológicas do carcinoma escamoso do colo uterino com a densidade de microvasos determinada pelo anticorpo monoclonal anti-CD31

Características	Anti-CD31						Odds Ratio (IC95%)
	até 6,4 microvasos		6,5 ou mais microvasos		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
até 49	13	48,	17	63	30	56	Ref
50 ou mais	14	52	10	37	24	44	0,6 (0,2 a 1,62)
Diâmetro tumoral							
até 29 mm	10	39	11	41	21	40	Ref
30 mm ou +	16	62	16	59	32	60	0,9 (0,3 a 2,7)
Ignorado	1		0		1		
Grau histológico							
Diferenciado	17	63	9	35	26	49	Ref
Indiferenciado	10	37	17	65	27	51	3,2 (1,0 a 10,0)
Ignorado	1		0		1		
Invasão sanguínea							
Ausente	21	78	20	74	41	76	Ref.
Presente	6	22	7	26	13	24	1,2 (0,4 a 4,3)
Invasão linfática							
Ausente	15	56	15	56	30	56	Ref.
Presente	12	44	12	44	24	44	1,0 (0,3 a 2,9)
Invasão perineural							
Ausente	21	78	22	82	43	80	Ref.
Presente	6	22	5	18	11	20	0,8 (0,2 a 3,0)
Invasão estromal							
até 9 mm	12	44	7	26	19	35	Ref.
10 mm ou +	15	56	20	74	35	65	2,3 (0,7 a 7,2)
Linfonodo positivo							
Não	20	74	22	82	42	78	Ref.
Sim	7	26	5	19	12	22	0,7 (0,2 a 2,4)

5. Discussão

De acordo com os resultados desse estudo, a atividade angiogênica do carcinoma do colo uterino é maior no tipo histológico escamoso do que no adenocarcinoma. Tomando-se apenas os carcinomas escamosos, a atividade angiogênica é maior quando o grau histológico é indiferenciado e quando há linfonodos comprometidos.

A análise univariada mostrou que a densidade de microvasos determinada pelo CD34 associou-se com os carcinomas escamosos, em relação aos adenocarcinomas. Quando identificados pelo CD31, houve associação com os carcinomas indiferenciados.

Excluindo os casos de adenocarcinomas da análise univariada, a densidade de microvasos determinada pelo CD31 continuou mostrando associação com o carcinoma escamoso indiferenciado e quando determinada pelo BNH9, associou-se com linfonodos comprometidos.

Observou-se também que nenhum dos marcadores mostraram associação estatisticamente significante com invasão linfática. Todavia, o CD34 e o BNH9, ao analisar em conjunto os carcinomas escamosos e adenocarcinomas, mostraram OR de 2,6 com intervalo de confiança a 95% variando de 0,9 a 7,43. Ainda que o intervalo de

confiança contenha o valor 1, o limite inferior está muito próximo de um e o limite superior é alto. Assim, estes resultados poderiam ser considerados de significância limitrofe, uma vez que o poder estatístico de uma amostra de 62 casos permitiria identificar estatisticamente apenas grandes diferenças entre as categorias de uma variável.

O maior diâmetro do tumor, profundidade de invasão do estroma, invasão sanguínea e invasão perineural não estão associados com maior atividade angiogênica, conforme mostraram os marcadores de células endoteliais utilizados nesse estudo, CD34, BNH9 e CD31.

TJALMA *et al.* (1998), utilizando CD31, não encontraram associação significativa entre a média de microvasos por campo e o tipo histológico, grau de diferenciação, estágio, presença de linfonodos comprometidos e invasão de vasos linfáticos, porém, encontraram que tem um importante valor prognóstico. Posteriormente, utilizando ainda CD31, encontraram associação de alta densidade de microvasos com invasão vascular e com menor sobrevida global (TJALMA *et al.* 2001).

Di LEO *et al.* (1998), utilizando anticorpos monoclonais contra o antígeno relacionado ao fator VIII, CD31 e vimentina, estudaram a angiogênese em pacientes com recidiva de câncer do colo uterino após cirurgia radical e não encontraram associação entre a contagem de microvasos em relação ao *status* linfonodal, profundidade de invasão e diferenciação histológica. Todavia, encontraram associação entre a invasão vascular linfática e o maior número de vasos neoformados.

WIGGINS *et al.* (1995), utilizando antígeno relacionado ao fator VIII, observaram que o número de microvasos foi significativamente maior nos casos com carcinomas em relação aos controles. Nenhuma associação foi observada entre a angiogênese e o status linfonodal, envolvimento parametrial, profundidade de invasão ou doença macroscópica, contudo, a contagem de microvasos correlacionou-se com a invasão vascular.

Em um estudo de 122 pacientes com carcinoma epidermóide do colo uterino nos estádios Ib, IIa e IIb submetidas a cirurgia radical, HIRAKAWA *et al.* (1999), utilizando o anti-CD34 para determinar a densidade de microvasos, não encontraram associação desta com o estágio, invasão estromal, invasão do espaço linfovascular, metástase linfonodal pélvica e invasão parametrial. Também não encontraram associação com a sobrevida. Os microvasos foram definidos como grupos de células ou túbulos CD34 positivo com ou sem lúmen e foram contados em três campos com aumento de 200X, variando o número de microvasos de 17 a 174. Por sua vez CHENG *et al.* (1999) estudaram 35 pacientes com carcinoma invasivo do colo uterino, sendo 29 pacientes com carcinoma epidermóide, cinco com adenocarcinoma e uma com carcinoma de pequenas células. Observaram que a densidade de microvasos, utilizando o anti-CD34 correlacionou-se com a profundidade de invasão estromal e tamanho do tumor em uma análise de regressão simples ($r=0,436$ e $p=0,009$; $r=0,465$ e $p=0,005$, respectivamente). Os autores determinaram a densidade de microvasos nas três áreas de maior concentração de vasos que foram identificadas inicialmente com aumento de 40X e 100X. Após a identificação destas áreas de “hot spots”, os vasos foram contados com aumento de 200X e a média dos três campos foi calculada. A atividade angiogênica avaliada com CD34 também aumenta com

anormalidades neoplásicas, passando pelas lesões de baixo e alto graus, até carcinoma invasivo. Parece também que está relacionada com os HPV de alto risco. (NAIR *et al.*, 1999).

Portanto, com base nos resultados deste estudo e daqueles publicados na literatura, diferentes marcadores da angiogênese podem apresentar ou não associação com diferentes características anatomopatológicas do carcinoma do colo uterino. Observa-se que, quando há alguma associação, esta se dá principalmente entre alta atividade angiogênica com características anatomopatológicas de pior prognóstico.

O anticorpo monoclonal anti-CD34 é um bom marcador para células endoteliais, porém, também marca tumores vasculares, a camada muscular da aorta, células mesenquimais semelhantes a fibroblastos de localização perivascular em vários tecidos, fibroblastos, estroma do colo uterino, endotélio dos vasos linfáticos e adipócitos, o que pode interferir na contagem de microvasos (MIETTINEN *et al.*, 1994).

Esta característica do anti-CD34 torna-o pouco específico para determinar a angiogênese, ainda que seja bem sensível. É necessário, portanto, que o patologista faça a identificação morfológica das estruturas coradas, para que seja possível a caracterização adequada dos microvasos referentes ao processo de angiogênese.

A melhor sensibilidade do anti-CD34 pode explicar o fato de que neste estudo este anticorpo identificou vasos em todos os casos, o que não ocorreu em quatro casos com o anticorpo BNH9 e em 17 com o anti-CD31. Além disso, observou-se que a qualidade da coloração foi melhor do que a obtida como uso de outros anticorpos, sendo possível identificar qual a estrutura que estava corada e descartar aquelas que não correspondiam a

microvasos. Portanto, o CD34 está muito presente nas células endoteliais do carcinoma do colo uterino, tornando-o um bom marcador de microvasos para esta neoplasia.

Um estudo brasileiro, CALUX *et al.* (2001) estudaram a angiogênese em neoplasias do colo uterino, por meio de imunoistoquímica, utilizando dois anticorpos monoclonais, o anti-CD34 e antifator VIII de von Willebrand. A amostra foi representada por neoplasia invasiva (18 casos), lesão intra-epitelial de alto grau (15 casos), lesão intra-epitelial de baixo grau (15 casos) e colo uterino normais (dez casos), este utilizado como grupo controle. Os autores observaram que o anti-CD34 permitiu uma identificação de maior número de vasos que o antifator VIII.

Portanto, o anticorpo anti-CD34 cora bem o endotélio vascular do tecido neoplásico, ainda que core também várias outras estruturas. Todavia, a simples demonstração de que detecta maior número de vasos, não indica nem rejeita a sua utilização na prática clínica (MIETTINEN *et al.*, 1994).

A detecção do antígeno CD 34 em microvasos do tecido tumoral, como também do fator von Willebrand, é prejudicada pela coloração de vasos linfáticos. Embora nos tecidos neoplásicos a formação de novos vasos linfáticos parece não ocorrer (van NETTEN *et al.* 1995), a incorporação de vasos linfáticos preexistentes pode induzir a contagem falso-positiva quando estes antígenos forem utilizados como marcadores.

Embora o antifator VIII seja específico para o endotélio, o antígeno pode estar ausente em uma parte do endotélio capilar do tecido tumoral (VERMEULEN *et al.* 1995).

Neste estudo, o anticorpo BNH9 apresentou reatividade quantitativamente semelhante ao anti-CD34, o que também explica a melhor concordância obtida entre estes dois anticorpos. Uma característica do CD34 e BNH9 é a boa reatividade em tecidos parafinados porque as glicoproteínas carboidratadas usualmente são resistentes a vários fixadores, característica que também o CD31 também tem (STROSS, WARNKE, FLAVELL, 1989). Os resultados observados nesse estudo não mostraram conflitos, no sentido, por exemplo, de que um marcador tenha se associado positivamente com carcinoma indiferenciado e outro com carcinoma diferenciado. A análise cuidadosa mostrou que algumas associações poderiam ter sido significantes se o tamanho amostral fosse maior.

A contagem de microvasos por meio de imunoistoquímica não tem consenso na literatura quanto à metodologia. Entretanto, a técnica que mais tem sido utilizada foi descrita por WEIDNER *et al.* (1991), que descreveu um método para contagem de microvasos em pacientes com carcinoma de mama, que consiste em identificar áreas com elevada densidade vascular e contagem dos vasos nestas áreas (“*hot spots*”).

Entretanto, a racionalidade para determinar a densidade de microvasos em áreas selecionadas da neoplasia comparada à contagem global é controversa na literatura (VERMEULEN *et al.* 1996), pois do ponto de vista prático, dado à heterogeneidade intratumoral, a obtenção de reprodutibilidade na densidade de microvasos implica a avaliação de grandes áreas do tumor. Do ponto de vista fisiopatológico espera-se que as áreas de alta concentração de microvasos sejam devidas a existência de clones de células tumorais angiogênicas nestas áreas.

A primeira dificuldade na avaliação da densidade de microvasos é selecionar uma área representativa do tumor. WEIDNER *et al.* (1991) selecionaram blocos de parafina contendo componente invasivo do câncer de mama na coloração hematoxilina-eosina. A utilização de vários blocos de parafina de um mesmo tumor para selecionar as melhores áreas para contar os microvasos produz resultados mais precisos do que a utilização de um bloco apenas (De JONG *et al.*, 1995).

No carcinoma do colo uterino, nem sempre é possível obter muitos blocos, principalmente nos casos inoperáveis e naqueles em que o volume tumoral é pequeno. Para uma neoplasia, a contagem de microvasos em diferentes blocos do mesmo caso apresenta variação. MARTIN *et al.* (1996) estudaram a densidade de microvasos em três diferentes blocos de parafina de câncer de mama, cada um com uma amostra central e periférica do tumor. A contagem de microvasos entre os blocos variou até em 20% em 14 dos 20 casos estudados (70%). Estes resultados estão de acordo com os achados de Van HOEF *et al.* (1993) que também relataram uma taxa de concordância de 71-78% entre diferentes blocos de parafina de câncer de mama.

As áreas de alta densidade vascular devem ser determinadas com pequeno aumento (10-100X), e o treinamento e experiência do patologista é importante na seleção das áreas de alta densidade vascular (*hot spots*). Para analisar a subjetividade na identificação destas áreas, BARBARESCHI, *et al.*, (1995) compararam a densidade de microvasos em 91 pacientes com carcinoma de mama obtida por dois patologistas com experiências diferentes. Com base na análise univariada e multivariada, estes pesquisadores

encontraram que somente a densidade de microvasos determinada pelo patologista mais experiente associou-se significativamente com a sobrevida livre de doença.

As áreas de maior densidade de microvasos são encontradas principalmente na periferia do tumor, representando áreas de células tumorais viáveis (sem necrose ou esclerose) que poderiam determinar disseminação sistêmica da neoplasia (VERMEULEN *et al.* 1996).

Sabe-se que não é possível comparar valores absolutos de densidade de microvasos entre diferentes estudos também pela variação da técnica de observação. O mesmo aumento para diferentes microscópicos pode corresponder a uma área de análise de diferente extensão. O tamanho do campo para contagem dos microvasos utilizado por WEIDNER *et al.* (1991) foi de $0,74 \text{ mm}^2$, entretanto, uma ampla variação na magnificação e tamanho do campo tem sido relatado na literatura, variando de $0,12$ a 1 mm^2 , também em virtude das características técnicas dos microscópios (VERMEULEN *et al.* 1996).

É evidente que contagens realizadas com menor aumento apresenta maior número de microvasos do que com maior aumento porque a primeira analisa uma área tumoral maior. Para tentar eliminar este efeito, alguns pesquisadores têm apresentado seus resultados em número de microvasos por mm^2 da área do corte histológico (TAKEBAYASHI *et al.* 1996; VERMEULEN *et al.* 1996).

Também é esperado que quando se seleciona apenas cinco campos para estabelecer a densidade de microvasos obtenha-se valores mais altos de que quando se

seleciona dez campos, porque a seleção começa a partir dos campos com maior concentração de vasos.

A contagem de microvasos descrita por WEIDNER *et al.* (1991) em câncer de mama, considera como unidade vascular isolada qualquer célula ou grupo de células endoteliais coradas, claramente separada de microvasos adjacentes, células tumorais ou tecido conjuntivo. A presença de lúmen ou hemácias não foi requerida para definição de microvasos. A aplicação destes critérios que parecem mais objetivos também está associada a variação interobservador na determinação da densidade de microvasos consoante VERMEULEN *et al.* (1996). Neste estudo foram adotados os critérios de WEIDNER *et al.* (1991).

Enfim, os profissionais precisam ser cuidadosos ao considerar resultados da imunoistoquímica no contexto dos dados existentes na literatura, inclusive porque o entendimento da expressão de antígenos em neoplasias ainda é muito limitado. Os patologistas devem estar atentos ao que consideram típico e às infidelidades antigênicas descritas para uma determinada entidade, como também às falhas que podem ser introduzidas por fatores técnicos, tais como processamento e fixação dos tecidos e aquelas dos procedimentos da própria imunoistoquímica (MURO-CACHO *et al.*, 2002).

Em suma, os resultados desse estudo, associados ao conhecimento que se dispõe na literatura e considerando as vantagens e as limitações da imunoistoquímica, aponta para que se explore o CD34 e BNH9 como fator prognóstico e, principalmente, como fator preditivo da resposta de diferentes terapêuticas para o carcinoma do colo uterino. É nesse sentido que esse conhecimento pode qualificar a prática clínica no controle dessa neoplasia.

6. Conclusões

Os resultados deste estudo mostraram:

1. a densidade de microvasos é maior quando utilizaram-se os anticorpos monoclonais anti-CD34 e BNH9 do que com anti-CD31;
2. a concordância para determinar a densidade de microvasos é melhor entre os anticorpos monoclonais anti-CD34 e BNH9;
3. maior densidade de microvasos determinada pelo anticorpo anti-CD34 associou-se com carcinoma do colo uterino do tipo histológico escamoso;
4. maior densidade de microvasos determinada pelo anticorpo anti-CD31 associou-se com carcinoma indiferenciado;
5. maior densidade de microvasos determinada pelo anticorpo BNH9 associou-se com linfonodos comprometidos no carcinoma escamoso do colo uterino;

6. a atividade angiogênica é mais alta nos carcinomas escamosos, nos carcinomas indiferenciados e quando houver linfonodos comprometidos no carcinoma escamoso.

7. Referências Bibliográficas

- ABULAFIA, O.; TRIEST, W.E.; SHERER, D.M. Angiogenesis in squamous cell carcinoma in situ and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. **Obstet Gynecol**, 88:927-32, 1996.
- AGUAYO, A.; KANTARJIAN, H.M.; ESTEY, E.H.; GILES, F.J.; VERSTOVSEK, S.; MANSHOURI, T.; GIDEAL, C.; O'BRIEN, S.; KEATING, M.J.; ALBITAR, M. Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. **Cancer**, 95(9):1923-30, 2002.
- ALTMAN, D.G. **Practical statistics for medical research**. London: Ed. Chapman & Hall, 1991. 611p.
- AUGUSTIN, H.G. Antiangiogenic tumor therapy: will it work? **Trends Pharmacol Sci**, 19:216-22, 1998.
- BARBARESCHI, M.; WEIDNER, N.; GASPARINI, G. Microvessel density quantification in breast carcinomas. Assessment by light microscopy vs. Computer-aided image analysis system. **Appl Immunohistochem**, 3:75-84, 1995.

BENITEZ-BRIBIESCA, L.; WONG, A.; UTRERA, D.; CASTELANOS, E. The role of mast cells tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **J Histochem Cytochem**, 49:1061-2, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde/ Conselho Nacional de Saúde - Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. **Bioética**, 4(supl.2):12-25, 1996.

BREMER, G.L.; TIE BOSH, A.T.; van PUTTEN, H.W.; SCHOUTEN, H.J.; de HAAN, J.; ARENDS, J.W. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. **Am J Obstet Gynecol**, 174(1):126-31, 1996.

CALUX, N.M.C.T.; RIBALTA, J.C.L.; STAVALE, J.N.; FOCCHI, J.; BARACATI, E.C.; LIMA, G.R. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino: comparação entre dois marcadores de células endoteliais. **Rev Bras Gin Obstet**, 23(5):313-9, 2001.

CARY, N.C. SAS Institute Inc. SAS/STAT software changes and enhancements through release 8.2. SAS Institute, Inc. 1999-2001.

CHENG, W.F.; LEE, C.; CHU, J.; CHEN, C.; CHEN, T.; SHAU, W.; HSIEH, C.; HSIEH, F. Vascularity index as a novel parameter for the in vivo assessment of angiogenesis in patients with cervical carcinoma. **Cancer**, 85:651-7, 1999.

COMAN, D.R.; SHELDON, W.F. The significance of hyperemia around tumor implants. **Am J Pathol**, 22:821, 1946.

COSTA, M.J.; GUINEE, D. Jr. CD 34 immunohistochemistry in female genital tract carcinosarcoma(malignant mixed mullerian tumors) supports a dominant role of the carcinomatous component. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 8(4):293-9, 2000.

DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J. Angiogenesis in uterine cervical intra-epithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. **Int J Gynecol Pathol**, 16(4):335-8, 1997.

DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; GOTLIEB, W.H.; LERNER-GEVA, L.; BEN-BARUCH, G.; AGULANSKY, L.; NOVIKOV, I.; KOPOLOVIC, J. Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma - clinicopathologic correlation. **Acta Obstet Gynecol Scand**, 78(3):240-4, 1999.

DECLARAÇÃO DE HELSINQUE II. Sobre os princípios éticos para as pesquisas em seres humanos. 2000. [Acesso – 20/04/2002]. Disponível na Internet:

www.ibemol.com.br/declarações/helsinque

de JONG, J.S.; van DIEST, P.J.; BAAK, J.P.A. Heterogeneity and reproducibility of microvessel count in breast cancer. **Lab Invest**, 73:992-6, 1995.

DELLAS, A.; MOCH, H.; SCHULHEISS, E.; FEICHTER, G.; ALMENDRAL, A.C.; GUDAT, F.; TORHORST, J. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinoma with clinicopathological correlations. **Gynecol Oncol**, 87: 751-4, 1996.

DELMOTTE, P.; MARTIN, B.; PAESMANS, M.; BERGHMANS, T.; MASCAUX, C.; MEERT, A.P.; STEELS, E.; VERDEBOUT, J.M.; LAFITTE, J.J.; SCULIER, J.P. The role of vascular endothelial growth factor in the survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis. **Rev Mal Respir**, 19(5):577-84, 2002.

DELSOL, G.; BLANCHER, A.; al SAATI, T.; RALFKIAER, E.; LAURITZEN, A.; BRUIGERES, L.; BROUSSET, P.; RIGAL-HUGUET, F.; MAZEROLLES, C.; ROBERT, A. Antibody BNH9 detects red blood cell-related antigens on anaplastic large cell(CD30+) lymphomas. **Br J Cancer**, 64(2):321-6, 1991.

Di LEO, S.; CASCHETTO, S.; GAROZZO, G.; NULIFORO, G.; CASSARO, N.; MELLM, T.; Di MAURO, R.; CARAGLIANO, L. Angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. **Eur J Gynaec Oncol**, XIX(2):158-62, 1998.

DINH, T.V.; HANNIGAN, E.V.; SMITH, E.R.; HOVE, M.J.; CHOPRA, V.; TO, T. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. **Obstet Gynecol**, 87:751-54, 1996.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implication. **N Engl J Med**, 285:1182-6, 1971.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **N Engl J Med**, 333(26):1757-63, 1995a.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. **Nat Med**, 1:27-31, 1995b.

GALO, O.; MASINI, E.; BIANCHI, B.; BRUSCHINI, L.; FRANCHI, A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Hum Pathol**, 33(7):708-14, 2002.

GUIDI, A.J.; ABUJAWEH, G.; BERSE, B.; JACKMAN, R.W.; TOGNAZZI, K.;

DUORAK, H.F.; BROWN, L.F. Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, 87:1237-45, 1995

HANNAN, G.N.; McAUSLAN, B.R. Modulation of synthesis of specific proteins in endothelial cells by copper, cadmium and disulfiram: An early response to an angiogenic inducer and cell migration. **J Cel Physiol**, 11:207-19, 1982.

HARRIS, A.L. Antiangiogenesis for cancer therapy. **Lancet**, 349(SII):13-5, 1997.

HEIMBURG, S.; OEHLER, M.K.; KRISTEN, P.; PAPADOUPOULOS, T.; CAFFIER, H. The endothelial marker CD 34 in the assessment of tumor vascularisation in ovarian câncer. **Anticancer Res**, 17(4B):3149-51, 1997.

HEIMBURG, S.; OEHLER, M.K.; PAPADOUPOULOS, T.; CAFFIER, H.; KRISTEN, P.; DIETL, J. Prognostic relevance of the endothelial marker CD 34 in ovarian câncer. **Anticancer Res**, 19(4A):2527-9, 1999.

HIRAKAWA, T.; KAMURA, T.; KAKU, T.; AMADA, S.; ARIYOSHI, K.;

KINUKAWA, N.; NAKANO, H. Prognostic significance of epithelial-stromal vascular cuffing and microvessel density in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, 74:369-74, 1999.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M.S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat Med**, 1:149-53, 1995.

KAINZ, C.; SPEISER, P.; WANNER, C.; OBERMAIR, A.; TEMPFER SLIUTZ, G.; REINTHALLER, A; BNEITENECKER, G. Prognostic value of tumor microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. **Anticancer Res**, 15:1549-51, 1995.

KAKU, T.; HIRAKAWA, T.; KAMURA, T.; AMADA, S.; KINUKAWA, N.; KOBAYASHI, H.; SAKAI, K.; ARIYOSHI, K.; SONODA, K.; NAKANO, H. Angiogenesis in adenocarcinoma of the uterine cervix. **Cancer**, 83:1384-90, 1998.

KUZU, I.; BICKNELL, R.; HARRIS, A.L.; JONES, M.; GATTER, K.C.; MASON, D.Y. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumors. **J Clin Pathol**, 45(2):143-8, 1992.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.C. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33: 159-74, 1977.

LENCZEWSKI, A.; TERLIKOWSKI, S.; FAMULSKI, W.; SULKOWSKA, M.; KULIKOWSKI, M. Angiogenesis as a prognostic factor in invasive carcinoma of the uterine cervix. **Folia Histochem et Cytobiol**, 39:165-6, 2001.

LEUNG, K.M.; CHAN, W.Y.; HUI, P.K. Invasive squamous cell carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia III of uterine cervix. **Am J Clin Pathol**, 101:508-13, 1994.

LIOTTA, L.; KLEINERMAN, J.; SAILDEL, G. Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastasis following tumor impantation. **Cancer Res**, 34:997-1004, 1974.

LI, V.W.; FOLKERTH, R.D.; WATANABE, H.; YU, C.; RUPNICK, M.; BARNES, P.; SCOTT, R.M.; BLACK, P.M.; SACLAN, S.E.; FOLKMAN, J. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. **Lancet**, 334:82-6, 1994.

MARTIN, L.; HOLCOMBE, C.; GREEN, B.; WINSTANLEY, J.W.; LEINSTER, S.J. Vascular heterogeneity in breast cancer assessed by microangiography and immunohistochemistry. **Br J Surg**, 83:702, 1996.

McNAMARA, D.A.; HARMEY, J.H.; WALSH, T.N.; REDMOND, H.P.; BOUCHIER-HAYES, D.J. Significance of angiogenesis in cancer therapy. **Br J Surg**, 85(8):1044-55, 1998.

MIETTINEN, M.; LINDENMAYER, A.E.; CHAUBAL, A. Endothelial cell markers CD31, CD34 and BNH9 antibody to H- and Y-antigens-evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. **Mod Pathol**, 1: 82-90, 1994.

MURO-CACHO, C.A. Pathology Update: The role of immunohistochemistry in the differential diagnosis of soft-tissue tumors. Disponivel na internet (acesso 10/07/02) – www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/v5n1/department5.html

NAIR, P.; ANGADEVI, T.; JAYAPRAKASH, P.G.; NAIR, M.B.; NAIR, M.K.; PILLAI, M.R. Increased angiogenesis in the uterine cervix associated with human papillomavirus infection. **Pathol Res Prac**, 195(3):163-9, 1999.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - disponível na internet: [Acesso 12.07.02]. - www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table.

NICOSIA, R.F.; BONANNO, E.; SMITH, M. Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. **J Cel Physiol**, 154:654-61, 1993.

NGUYEN, M.; WATANABE, H.; BUDSON, A.E.; RICHIE, J.P.; HAYES, D.F.; FOLKMAN, J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. **J Natl Cancer Inst**, 86:356-61, 1994.

OBERMAIR, A.; WANNER, C.; BILGI, S.; SPEISER, P.; KAIDER, A.; REINTHALLER, A.; LEODOLTER, S.; GITSCHE, G. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival. **Am J Obstet Gynecol**, 178:314-19, 1998.

RUTGERS, J.L.; MATTOX, T.F.; VARGAS, M.P. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. **Int J Gynecol Pathol**, 14: 114-8, 1995.

SCHLENGER, K.; HÖCKEL, M.; MITZE, M.; SCHAFFER, V.; WEIKEL, W.; KNAPSTEIN, P.G.; LAMBERT, A. Tumor vascularity: a novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. **Gynecol Oncol**, 59(1):57-66, 1995.

SRIVASTAVA, A.; LAIDLER, P.; DAVIES, R.P.; HORGAN, K.; HUGHES, L.E. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0,76-4,0mm thick) skin melanoma. **Am J Pathol**, 133(2):419-23, 1988.

SOLIMENE, A.C.C.; BOSCARDIN, S.B.; FERRAZ, M.G.M.C.; CHAMAS, R. Angiogênese em tumores sólidos. **Sboc Revista**, 1:9-20, 1999.

SMITH-McCUNE, K.K.; WEIDNER, N. Demonstration and characterization of angiogenic properties factor of cervical dysplasia. **Cancer Res**, 54(3):800-4, 1994.

STROSS, W.P., WARNKE, R.A., FLAVELL, D.J. Molecule detected in formalin fixed tissue by antibodies MT1, DFT1 and L60 (Leu-22) corresponds to CD43 antigen. **J Clin Pathol**, 42:953, 1989.

TAKEBAYASHI, Y., AKIYAMA, S., YAMADA, K., AKIBA, S., AIKOU, T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. **Am Cancer Soc**, 78(2): 226-31, 1996.

TJALMA, W.; VAN MARCK, E.; WEYLER, J.; DIRIX, L.; Van DAELE, A.; GOOVAERTS, G.; ALBERTYN, G.; Van DAM, P. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. **Br J Cancer**, 78(2):170-4, 1998.

TJALMA, W.; WEYLER, J.J.; BOGERS, J.J.; POLLEFLIET, C.; BAAY, M.A.R.C.;
GOOVAERTS, G.C.; VERMORKEN, J.B.; van DAM, P.A.; van MARCK, E.A.;
BUYTAERT, P.M. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV
and angiogenesis) in invasive cervical cancer. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**,
97:223-30, 2001.

TOM LINSON, R.H.; GRAY, L.H. The histological structure of some human lung cancers
and the possible implications for radiotherapy. **Br J Cancer**, 9:539, 1995.

TRAWEEK, S.T.; KANDALAFI, P.L.; MEHTA, P.; BATTIFORA, H. The human
hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. **Am J Clin Pathol**,
96(1):25-31, 1991.

Van HOEF, M.E.; KNOX, W.F.; DHESI, S.S.; HOWELL, A.; SCHOR, A.M.
Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive
breast cancer. **J Eur Cancer**, 29A(8):1141-5, 1993.

Van NETTEN, J.P.; CANN, S.A.; van der WESTHUIZEN, N.G. Angiogenesis and tumor
growth (correspondence- reply by Folkman J). **N Engl J Med**, 334:920-1, 1995.

VERMEULEN, P.B.; VERHOEVEN, D.; FIERENS, H.; HUBENS, G.; GOOVAERTS,
G.; Van MARCK, E.; De BRUIJN, E.A.; Van OOSTEROM, A.T.; DIRIX, L.Y.
Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical
study. **Br J Cancer**, 71(2):340-3, 1995.

- VERMEULEN, P.B.; GASPARINI, G.; FOX, S.B.; TOI, M.; MARTIN, L.; McCULLOCH, P.; PEZZELLA, F.; VIALE, G.; WEIDNER, N.; HARRIS, A.L.; DIRIX, L.Y. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. **Eur J Cancer**, 32A(14):2474-84, 1996.
- WARREN, B.A.; GREENBLATT, M.; KOMMINENI, V.R. Tumor angiogenesis ultrastructure of endothelial cells in mitosis. **Br J Exp Pathol**, 53(2):216-24, 1972.
- WEIDNER, N.; SEMPLE, J.P.; WELCH, W.R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast cancer. **N Engl J Med**, 324(1):1-8, 1991.
- WEIDNER, N.; FOLKMAN, J.; POZZA, F.; BEVILACQUA, P.; ALLRED, E.N.; MOORE, D.H.; MELI, S.; GASPARINI, G. Tumor angiogenesis: a new significant independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, 84(24):1875-87, 1992.
- WIGGINS, D.L.; GRANAI, C.O.; STEINHOFF, M.M.; CALABRESI, P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. **Gynecol Oncol**, 56(3):353-6, 1995.
- YUAN, A.; YU, C.I.; LUH, K.T.; KUO, S.H.; LEE, Y.C.; YANG, P.C. Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, 20(4):900-10, 2002.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A. –
Manual para normatização de publicações técnico-científicas. 4^a ed., Editora
UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências
Médicas, Unicamp. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p.
(alterado 2002)

9. Anexos

FICHA PARA COLETA DOS DADOS

NÚMERO DO PRONTUÁRIO

NÚMERO ANATOMOPATOLÓGICO:

IDADE (EM ANOS)

TIPO HISTOLÓGICO (1) CEC (2) ADENOCARCINOMA

MAIOR DIÂMETRO DO TUMOR EM MM

PROFUNDIDADE DE INVASÃO DO ESTROMA EM MM

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO: (1) G1 (2) G2 (3) G3

LINFONODOS DISSECADOS (NÚMERO TOTAL)

LINFONODOS COMPROMETIDOS: (0) NÃO (1) SIM

LINFONODOS COMPROMETIDOS (NÚMERO)

INVASÃO VASCULAR: (0) AUSENTE (1) PRESENTE

INVASÃO LINFÁTICA: (0) AUSENTE (1) PRESENTE

INVASÃO PERINEURAL: (0)AUSENTE (1) PRESENTE

NÚMERO DE MICROVASOS (TOTAL)

MÉDIA DE MICROVASOS