

CORRELAÇÃO DO VEGF-C E COX-2 EM ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS COMO PREDITORES DE POTENCIAL METASTÁTICO E PROGNÓSTICO EM PACIENTES DO HOSPITAL ARAÚJO JORGE, GOIÂNIA-GO.

Eliane Duarte MOTA, Ana Paula JUNQUEIRA-KIPNIS, Vera Aparecida SADDI, Gustavo Nogueira CAIXETA, Thelma Lima e SILVA, Eliana Maria PIMENTA, Karla Cordeiro Ferreira de SOUSA, Abadio de Oliveira da COSTA-JUNIOR, João Alves de ARAÚJO-FILHO.

Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás

Palavras-chave: câncer, angiogênese, linfangiogênese, metástase.

Endereço eletrônico: mdelianemota@gmail.com

Introdução

Câncer colorretal, segundo definição pelo grupo de médicos especialistas da Clínica Mayo e pelo Instituto Nacional de Câncer (NCI), dos Estados Unidos, e aceita mundialmente, é o câncer que acomete o cólon (intestino grosso) e em sua porção distal, o reto.¹⁵ Em relação à incidência, o câncer colorretal é a terceira causa mais comum de câncer no mundo, sem preferência de gênero, sendo a segunda causa em países desenvolvidos.¹⁴ A maioria destas neoplasias malignas são adenocarcinomas, que são neoplasias de células epiteliais produtoras de muco ou outros fluidos.¹⁶ Os principais fatores de risco para o câncer colorretal são: idade acima de 50 anos; história familiar de câncer de cólon e reto; história pessoal pregressa de câncer de ovário, endométrio ou mama; dieta com alto conteúdo de gordura, carne e baixo teor de cálcio; obesidade e sedentarismo. Há também outros fatores, tais como: doenças inflamatórias como retocolite ulcerativa crônica e Doença de Crohn; algumas condições hereditárias (Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC)).¹⁷

Quanto à sobrevida, nestas situações, é considerada boa se a doença for diagnosticada em estágio inicial. A sobrevida média global em cinco anos varia entre 40% e 50%, não sendo observadas grandes diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento.^{1, 5, 14}

Devido as grandes diferenças no resultado de sobrevida entre pacientes que apresentam ou desenvolvem metástases e aqueles com tumores órgãos-confinados ou com doença não recorrente, vários estudos tem se focado na descoberta de marcadores de prognóstico. Tem se abordado os produtos de expressão gênica, visando a identificação de fatores que favoreçam o melhor entendimento do prognóstico do câncer colorretal, incluindo a predição de metástases ocultas. ^{1, 5, 14}

Evidências experimentais indicam que a super-expressão dos genes de Fator de Crescimento Endotelial Vascular C (VEGF-C), e da Cicloxigenase-2 (COX-2) promovem a angiogênese e a linfangiogênese, sendo ambos os processos essenciais para o crescimento e disseminação de células tumorais. ¹² O aumento da expressão dos fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) é frequentemente relacionado com fenótipos tumorais agressivos e de mau prognóstico, no entanto, a relação entre a expressão de VEGF e a sobrevida permanece obscura. ¹

As enzimas da família das cicloxigenases (COX), COX-1 e COX-2, desempenham um papel-chave na conversão do ácido aracdônico (AA) em prostaglandinas, as quais têm sido associadas com a carcinogênese colorretal. ⁶ A expressão aumentada de COX-2 no câncer colorretal humano e no tecido adenomatoso é mais frequente que na mucosa normal. Entretanto, dados sobre a relação entre a expressão de COX-2 e a sobrevida dos pacientes ainda não são conclusivos. ^{4,8}

Como o VEGF-C e o COX-2 participam ativamente da tumorigênese, as expressões destes marcadores biológicos poderiam estar associadas diretamente à capacidade metastática do câncer colorretal e a sobrevida dos pacientes, logo, o presente estudo visa detectar e avaliar a co-expressão do fator de crescimento endotelial vascular-C (VEGF-C) e Cicloxigenase-2 (COX-2) no adenocarcinoma colorretal humano de pacientes do Hospital Araújo Jorge em Goiânia-GO.

Metodologia

Pacientes

Foi realizado um estudo retrospectivo dos pacientes operados no Hospital Araújo Jorge da ACCG e diagnosticados em seu Setor de Anatomia Patológica

durante o período de 1998 a 2004 (cinco anos de seguimento). Os sujeitos da pesquisa foram identificados através do levantamento de todos os casos de adenocarcinoma colorretal, tendo-se coletado os dados clínicos nos prontuários e após isso, realizou-se a busca e análise do material tumoral embocado em parafina utilizando o estudo imuno-histoquímico e a análise microscópica convencional por Hematoxilina & eosina. Os sujeitos da pesquisa receberam uma identificação numerada em planilhas de dados, preservando a confidencialidade e privacidade dos pacientes do estudo.

O estudo avaliou 128 pacientes consecutivos diagnosticados e operados no Hospital Araújo Jorge, os quais tiveram os linfonodos retirados, sendo que em 19 casos não foi possível resgatar dados de sobrevivência em cinco anos por perda de seguimento e/ou mudança de endereço, sendo que estes dados foram excluídos dos resultados.

Os sujeitos da pesquisa receberam uma identificação numerada em planilhas de dados, preservando a confidencialidade e privacidade dos pacientes do estudo. Este projeto foi aprovado pelo CEP da ACCG sob protocolo número: 042/2010.

Imuno-histoquímica

Três cortes de tecido parafinado (em bloco de parafina), os quais foram previamente fixados por formol a 10% tamponado, foram cortados em micrótomo rotatório manual Leica na espessura de 3 a 4 micra e posteriormente colocados, cada um, em uma lâmina de vidro previamente silanizada e imediatamente identificada. Os cortes de tecido foram desparafinados e reidratados através de uma sequência de alcoóis de 70 a 99 GL. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Na recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato 10mM (pH 6.0) pelo calor em panela de pressão. Os antígenos VEGF-C e COX-2 foram identificados usando anticorpos monoclonais anti-humanos de camundongo em diluições de 1/800 para COX-2 e 1/400 para VEGF-C. Após a aplicação dos anticorpos nos tecidos seguiu-se a incubação dos mesmos num processo de overnight em geladeira, utilizando um anticorpo secundário ligado a 3,30-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno e depois contra-corado pela hematoxilina de Mayer. Tecidos com positividade

comprovada para as proteínas pesquisadas foram incluídos nas reações para cada um dos antígenos, bem como amostras de tecido colorretal normal, para servirem de controles positivos e negativos externos em cada processo.

Resultados

O estadiamento para a classificação dos pacientes em grupos conforme a gravidade da doença, foi baseado no estadiamento preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia; Lippincott-Raven Publishers, 2007:83. A classificação designa estágio 1 para os pacientes com T (tumor) 1 e T2 com N (linfonodo) 0 (tumores que invadem até a camada muscular própria da parede colorretal e sem metástases em linfonodos), o estágio 2 é designado para os T3 e N0 (tumores invadindo até a serosa, sem metástases linfonodais) e o estágio 3 para os tumores qualquer T e com N1 em diante (qualquer nível de invasão do tumor e presença de metástases em linfonodos).

Os indivíduos utilizados no estudo foram distribuídos homoganeamente nos grupos de acordo com o estadiamento tumoral ($p>0,05$).

Os resultados mostram que a população de estudo possui média de idade de 61,8 anos (desvio padrão de 15,17), sendo a idade mínima 25 anos e a idade máxima de 87 anos. Quando analisamos o fator de risco associado ao óbito quanto ao estadiamento, não observamos significância estatística entre os grupos ($p>0,05$).

Para avaliar se a quimioterapia e radioterapia favoreceram a sobrevida dos pacientes, os dados foram distribuídos por estadiamento tumoral e avaliados por teste de qui-quadrado, podendo-se observar que os tratamentos realizados nesta população não alteraram a sobrevida dos pacientes ($p>0,05$).

Discussão

No presente estudo, podemos observar que a população estudada é homogênea quanto aos grupos de estadiamento da doença e com uma média de idade na sétima década de vida e que o tratamento quimioterápico ou quimioterápico e radioterápico (antes ou depois da cirurgia com ressecção da peça cirúrgica), neste grupo de estudo, não afetou a sobrevida dos pacientes.

Em relação à molécula VEGF-C, analisamos quantidades percentuais de expressão em relação à sobrevida com teste de qui-quadrado e pudemos observar que o aumento de sua expressão, por si só, não afetou a sobrevida dos pacientes do estudo ($p>0,05$).²⁰

Na análise da expressão da molécula COX-2 vinculada ao ponto de corte de 50% devido sua alta expressão em tumores malignos colorretais (cerca de 83% na literatura)¹⁷, analisamos sua correlação com a sobrevida pelo teste de Fischer e também observamos que a intensidade de sua expressão não teve impacto na sobrevida dos pacientes do estudo ($p>0,05$), estando de acordo com autores como Brambilla et al. e Petersen et al.^{17,19}

Em virtude dos dados apresentados, consideramos que, na população de estudo, precisaremos buscar ainda outros parâmetros moleculares ou de outra natureza para a correlação com a sobrevida, associados ou não às moléculas COX-2 e VEGF-C, a fim de tentarmos avançar no estabelecimento de marcadores potenciais de prognóstico e de possíveis novos alvos de tratamento para o câncer colorretal.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes quanto ao estadiamento em relação à sobrevida em 5 anos.

Estadiamento	Sobrevida		Total
	Óbito	Vivo em 5 anos	
Estágio 1	11 (15,5%)	13 (34,2%)	24 (22,0%)
Estágio 2	19 (26,8%)	10 (26,3%)	29 (26,6%)
Estágio 3	41 (57,7%)	15 (39,5%)	56 (51,4%)
Total	71 (65,1%)	38 (34,9%)	109 (100,0%)

Tabela 2. Distribuição dos pacientes quanto ao tratamento quimioterápico e/ou quimioterápico e radioterápico (QtRt) em relação à sobrevida em 5 anos.

QtRt	Sobrevida		Total
	Óbito	Vivo em 5 anos	
Não	20 (28,2%)	10 (26,3%)	30 (27,5%)
Pós	46 (64,8%)	26 (68,4%)	72 (66,1%)
Neo	5 (7,0%)	2 (5,3%)	7 (6,4%)
Total	71 (65,1%)	38 (34,9%)	109 (100,0%)

p = 0,904 ; teste: Qui-quadrado

Tabela 3. Distribuição dos pacientes quanto ao vegf-c em relação à sobrevida em 5 anos.

VEGF-C	Sobrevida		Total
	Óbito	Vivo em 5 anos	
Zero	11 (15,5%)	5 (13,2%)	16 (14,7%)
Até 30	8 (11,3%)	4 (10,5%)	12 (11,0%)
40 a 50	37 (52,1%)	19 (50,0%)	56 (51,4%)
Mais que 60	15 (21,1%)	10 (26,3%)	25 (22,9%)
Total	71 (65,1%)	38 (34,9%)	109 (100,0%)

p = 0,937 ; teste: Qui-quadrado

Tabela 4. Distribuição dos pacientes quanto ao cox-2 em relação à sobrevida em 5 anos.

Cox-2	Sobrevida		Total
	Óbito	Vivo em 5 anos	
Zero	1 (1,4%)	1 (2,6%)	2 (1,8%)
Até 50	5 (7,0%)	3 (7,9%)	8 (7,3%)
Mais que 50	65 (91,5%)	34 (89,5%)	99 (90,8%)
Total	71 (65,1%)	38 (34,9%)	109 (100,0%)

p = 0,289 ; teste: Fisher

Referencias bibliográficas

1. Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H. Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res.* 2006;38(6):540-4. Epub 2006 Nov 3.
2. Marquardt F, Rödel F, Capalbo G, Weiss C, Rödel C, Strahlenther O. Molecular targeted treatment and radiating therapy for rectal cancer. 2009 Jun;185(6):371-8.
3. Horta BA, Sodero AC, Alencastro RB. Investigating differential activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors. *J Mol Graph Model.* 2009.
4. Fux R, Schwab M, Thon KP, Gleiter CH, Fritz P. Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1;11(13):4754-60.
5. Pierobon M, Calvert V, Belluco C, Garaci E, Deng J, Lise M, Nitti D, Mammano E, De Marchi F, Liotta L, Petricoin E. Multiplexed cell signaling analysis of metastatic and non metastatic colorectal cancer reveals COX2-EGFR signaling activation as a potential prognostic pathway biomarker. *Clin Colorectal Cancer.* 2009 Apr;8(2):110-7.
6. Gong Z, Bostick RM, Xie D, Hurley TG, Deng Z, Dixon DA, Zhang J, Hebert JR. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 genes and risk of colorectal adenoma. *Int J Colorectal Dis.* 2009 Jun;24(6):647-54. Epub 2009
7. Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, Mukhtar H. A plant flavonoid fitsetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/INF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis.* 2009 Feb;30(2):300-7.
8. Castells A, Payá A, Alenda C, Rodríguez-Moranta F, Agrelo R, Andreu M, Piñol V, Castellví-Bel S, Jover R, Llor X, Pons E, Elizalde JI, Bessa X, Alcedo J, Saló J, Medina E, Naranjo A, Esteller M, Piqué JM. Cyclooxygenase2 expression in colorectal cancer with DNA mismatch repair deficiency. *Clin Cancer Res.* 2006 Mar 15;12(6):1686-92.
- 9 – Bernardeau-Mozer M, Chaussade S. Cyclooxygenase2 inhibitors and colorectal cancer. *Cancer.* 2004 May 1;91 Suppl 2:S89-98.
- 10 - Dannenberg AJ, Zakim D: Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol,* 1999, 26, 499–504.

- 11 – Hu WG, Li JW, Feng B, Beveridge M, Yue F, Lu AG, Ma JJ, Wang ML, Guo Y, Jin XL, Zheng MH. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using qualitative image analysis. *Eur Surg Res.* 2007;39(4):229-38.
- 12 – Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y, Iida S, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K. Coexpression of VEGF-C and COX-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum.* 2006 Mar;49(3):392-8.
- 13 – Xu T, Chen D, Chen J.J. Expression of vascular endothelial growth factor C and its correlation with lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2004;24(6):596-8.
- 14 - Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil, INCA.
- 15 - Mayo clinic - 1998-2009 Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER).
- 16 – Santos JR. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais - câncer de reto: tratamento cirúrgico. *Rev bras. colo-proctol.* vol.29 no.1 Jan./Mar. 2009.
- 17 - Brambilla, E; Moreira LF; Serafini, EP; Avaliação Imunoistoquímica da Proteína Ciclooxygenase-2 nas Neoplasias Colorretais e sua Relação com Fatores Patológicos Prognósticos, *Rev bras Coloproct* Julho/Setembro, 2007
- 18 - Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, *AJCC Cancer Staging Manual.* Philadelphia; Lippincott- Raven Publishers, 2007:83.
- 19 – Petersen S, Haroske G, Hellmich G, Ludwig K, Petersen C, Eicheler W. Cox-2 expression in rectal carcinoma: Immunohistochemical pattern and clinical outcome. *Anticancer Reserch* 2002;22:1225-30.
- 20 – Mutschall L, França PC, Ferreira LE. Análise da Relação entre a Expressão da proteína VEGF e o Estadiamento do Câncer Colorretal. *Rev bras Coloproct* Janeiro/Março, 2009.