

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia e Ciências Aplicadas à
Gastroenterologia

ANÁLISE DIGITAL DE IMAGEM E ESTEREOLOGIA DA ANGIOGÊNESE EM
ADENOMAS E NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL INVASIVO DE
SUBMUCOSA

CLÁUDIO TARTA

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla
Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia e Ciências Aplicadas à Gastroenterologia, UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, dezembro de 2003

Aos meus pais, Sérgio e Edy, pela formação e por terem proporcionado todas as condições e apoio para minha realização pessoal e profissional.

A minha esposa Dóris pelo carinho e apoio nos longos períodos de ausência para realização desta Tese e por ter me dado a maior alegria que já tive até hoje: minha filha Luiza.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. João Carlos Prolla, pela orientação e comprometimento com este projeto desde as suas etapas iniciais, pela constante procura de novos caminhos e por sua capacidade de dividir conhecimentos.

Ao Dr. Vinícius Duval da Silva, pela sua orientação, lançamento de novas idéias e dedicação nas inúmeras etapas para realização desta tese, além de apresentar-se como um profissional de extremo talento e dedicação à atividade científica.

Ao colega e amigo Dr. Cláudio Rolim Teixeira como exemplo de profissional e pesquisador, pela sua constante busca por novos conhecimentos, pela orientação e contribuições fundamentais para a realização deste trabalho com o lançamento da idéia inicial, fornecimento de material, sugestões e na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Edson Capp por todos estes anos de amizade e apoio constante para a realização desta tese, tendo um papel fundamental na interpretação dos resultados, formatação e redação final do texto.

Às Dras. Luise Meurer e Eunice Bernardes Toneloto pela amizade, dedicação e exemplo de profissionalismo, cuja participação em todas as etapas de execução desta tese foi de fundamental importância para a sua conclusão.

Ao Dr. Mário Wagner pela análise estatística criteriosa e importantes sugestões na interpretação e descrição dos resultados.

Ao amigo e colega Dr. César Chiele Neto, pelo apoio, colaboração e sugestões na execução desta pesquisa.

Aos professores Pedro Gus, João F. X. Müssnich e Mário Antonello Rosito com quem aprendi a especialidade de coloproctologia, pelos seus ensinamentos,

ativa participação na formação médico-cirúrgica e pelo constante estímulo para a conclusão deste trabalho.

Ao Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela minha formação técnica e humana durante o período de residência e pelo privilégio de dele fazer parte.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela excelência nas atividades assistenciais e de pesquisa.

Aos colegas do Serviço de Coloproctologia Daniel de Carvalho Damin e Paulo Carvalho Contu pelo companheirismo, encaminhamento de pacientes e constante apoio para a conclusão desta Tese.

Aos médicos residentes do Serviço de Coloproctologia com os quais tive o prazer de compartilhar as atividades diárias e pelo encaminhamento de pacientes: Dr. Aldo A. Cardoso, Daniel de Carvalho Damin, Marcos Weindorfer, Marcos B. Burger, Denise P. Fattore, Anderson R. Lazzaron e Márcio B. Caetano.

Ao Serviço de Patologia, Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas e ao Laboratório Medicina Digital pela oportunidade de execução das análises digitais de imagem e técnica imuno-histoquímica.

À funcionária Rosália Graebin Guimarães do Laboratório Medicina Digital pelo constante estímulo e pela qualidade na execução da técnica imuno-histoquímica.

Às funcionárias da Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Nilza de Barros, Rosicler L. B. Mendes pela disponibilidade e apoio sempre presentes.

Aos Profs. Sérgio Barros e João Carlos Prolla, coordenadores da Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela competente coordenação de um programa de elevada qualidade científica.

Aos funcionários administrativos e equipe de enfermagem da FUGAST e, em especial, aos colegas Dr. Cláudio Rolim Teixeira, Dr. Jorge Griebeler, Dr. Carlos Saul, Dr. Nelson Coelho e Dr. Ronaldo Torresini pelo fornecimento de parte

significativa do material utilizado nesta Tese, incluindo a magnificação das imagens endoscópicas, além de valiosas sugestões na análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Sérgio Carlos Nahas, professor e amigo, pelo constante incentivo à atividade acadêmica.

Às funcionárias do GPPG, Marta e Indara que com sua disponibilidade nos orientam corretamente nos trâmites administrativos.

À minha esposa, filha e familiares por todo o apoio e compreensão nos períodos de ausência para a realização deste trabalho.

Aos pacientes que, anonimamente, participaram deste trabalho.

Ao GPPG e FIPE/HCPA pelo apoio e financiamento parcial para a execução desta Tese.

A todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para que esta Tese fosse concluída.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODO	34
3.1 Delineamento	34
3.2 Material.....	34
3.3 Tamanho amostral	35
3.4 Critérios de classificação macroscópica e histopatológica das lesões colorretais	35
3.5 Imuno-histoquímica	39
3.6 Análise digital de imagem e quantificação microvascular.....	41
3.7 Estereologia nas lesões neoplásicas colorretais	47
3.8 Análise estatística	50
3.9 Aspectos éticos	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Quantificação microvascular absoluta (número de microvasos)	51
4.2 Quantificação microvascular relativa (microvasos/área hipervascular)	52
4.3 Análise estereológica (volume e extensão microvascular)	53

5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	74
7 PERSPECTIVAS.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9 ANEXO.....	86

RESUMO

A angiogênese é essencial no desenvolvimento neoplásico, associando-se às metástases à distância e recorrência em diversas neoplasias malignas. Em carcinomas colorretais, os parâmetros da análise digital de imagem e estereologia da angiogênese foram pouco estudados. Objetivo: avaliar parâmetros tridimensionais e a quantificação microvascular bidimensional nas diferentes apresentações morfológicas dos adenomas colorretais e no adenocarcinoma colorretal restrito à submucosa, a fim de determinar o papel da angiogênese nas diferentes etapas da seqüência adenoma-carcinoma e sua relação com as diferentes apresentações das lesões precursoras do carcinoma colorretal. Material e métodos: foi realizado estudo histórico de delineamento transversal, incluindo 115 lesões neoplásicas colorretais, ressecadas endoscópica ou cirurgicamente no período de 1997 a 2001, obtidas de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Fundação Universitária de Gastroenterologia (FUGAST). Para análise da angiogênese foram utilizadas as técnicas de imuno-histoquímica, análise digital de imagem, quantificação microvascular e estereologia. Os resultados foram apresentados como mediana e intervalos interquartis. Resultados: a quantificação microvascular foi progressivamente mais elevada nas lesões polipóides com displasia de alto grau comparadas às de baixo grau. Quanto maior o grau de atipia observado, maior foi o número de microvasos (regressão linear, $P < 0,05$). O volume e extensão

microvascular foram diferentes entre as fases evolutivas da neoplasia colorretal, resultando em aumento no volume 728 (416 - 1408) versus 178 (93 - 601) e extensão microvascular 242,4 (131,1 - 936,8) vs 24,0 (6,5 - 142,2) ($P < 0,001$) nas lesões polipóides com displasia de alto grau comparadas às de baixo grau, respectivamente. A quantificação microvascular foi progressivamente mais elevada, acompanhando a progressão neoplásica polipóide: displasia de baixo grau 41,8 (15,8 - 71,9), displasia de alto grau 60,0 (23,0 - 95,6) e carcinoma de submucosa 76,0 (37,5 - 132,6) ($P < 0,001$). Concomitante, o volume 956 (436 - 2188) vs 178 (93 - 601) e a extensão microvascular 534,6 (146,7 - 1262) vs 24,0 (6,5 - 142,2) foram mais elevados nos adenocarcinomas colorretais restritos à submucosa em relação às lesões polipóides com displasia de baixo grau, respectivamente ($P < 0,001$). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na angiogênese entre os adenomas polipóides e não-polipóides através da quantificação 41,8 (15,8 - 71,9) vs 22 (16 - 40) e estimativa da extensão microvascular 24 (6,5-142,2) vs 17,5 (4,4-54,7), respectivamente. Conclusão: a utilização da análise digital de imagem e estereologia acrescentou maior objetividade e eficácia na metodologia de avaliação angiogênica, pois permitiu a precisa segmentação das áreas hipervasculares, a representação da morfologia tridimensional característica do suprimento vascular e a identificação de diferenças na microvascularização nas etapas evolutivas do câncer colorretal.

ABSTRACT

Angiogenesis is essential in the tumoral development, associating with metastasis at distance and recurrence in several malignant neoplasias. In colorectal carcinomas, the parameters of the digital image analysis and stereology of angiogenesis have been little studied. Objective: evaluate three-dimensional parameters and the bidimensional microvascular quantification in the different morphologic presentations of the adenomas and in the submucosal colorectal carcinoma, in order to determine the role of angiogenesis in the different stages of the sequence adenoma-carcinoma and its relationship with the different presentations of the precursory neoplastic lesions of the colorectal carcinoma. Material and methods: transversal historical study was carried out, including 115 colorectal neoplastic lesions, obtained by endoscopy or surgical resection between 1997 and 2001, from the patients of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and of the Fundação Universitária de Gastroenterologia (FUGAST). For the analysis of angiogenesis, immunohistochemistry, digital image analysis, microvascular quantification and stereology were used. The results were presented as medium and interquartile range. Results: the microvascular quantification has gradually raised in the polypoid lesions with high degree dysplasia comparing to the ones of low degree. The bigger the degree of atipia, the higher was the number of microvessels (linear regression, $P < 0,05$). The volume and microvascular extension were different among

stages of the colorectal neoplasia, resulting in an increase of the volume 728 (416 - 1408) vs 178 (93 - 601) and microvascular extension 242,4 (131,1 - 936,8) vs 24,0 (6,5 - 142,2) ($P < 0.001$) in the polypoid lesions with comparative high degree dysplasia to the ones of low degree, respectively. The microvascular quantification was gradually raised, following the polypoid tumoral progression: low degree dysplasia 41,8 (15,8 - 71,9), high degree dysplasia 60,0 (23,0 - 95,6) and submucosal carcinoma 76,0 (37,5 - 132,6) ($P < 0.001$). Concomitantly, the volume 956 (436 - 2188) vs 178 (93 - 601) and microvascular extension 534,6 (146,7 - 1262) vs 24,0 (6,5 - 142,2) were more elevated in the submucosal carcinoma in relation to the polypoid lesions with low degree dysplasia, respectively ($P < 0.001$). There was no significant difference in angiogenesis between the polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas through the quantification 41,8 (15,8 - 71,9) vs 22 (16 - 40) and estimate of microvascular extension 24 (6,5 - 142,2) vs 17,5 (4,4 - 54,7), respectively. Conclusion: the use of the digital image analysis and stereology added greater objectivity and effectiveness in the methodology of angiogenic evaluation, because it allowed the accurate segmentation of hypervascular areas, the representation of characteristic three-dimensional morphology of vascular supply and identification of differences in the microvascularization in the evolutive stages of the colorectal cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Angiogênese	16
Figura 2 – Princípios da estereologia	30
Figura 3 – Adenoma colorretal polipóide	36
Figura 4 – Adenoma colorretal não-polipóide	37
Figura 5 – Adenoma colorretal não-polipóide: secção histológica	37
Figura 6 – Adenoma colorretal com displasia de baixo grau	38
Figura 7 – Adenoma colorretal com displasia de alto grau	39
Figura 8 – Adenocarcinoma colorretal	39
Figura 9 – Imuno-histoquímica: anticorpo anti-CD 31	41
Figura 10 – Captura digital de imagem	43
Figura 11 – Seleção da área hipervasculares	44
Figura 12 – Microvasos contáveis em área hipervasculares segmentada	45
Figura 13 – Segmentação digital da área hipervasculares	47
Figura 14 – Análise estereológica	49
Figura 15 – Quantificação microvascular absoluta	52
Figura 16 – Quantificação microvascular relativa (número de microvasos/área hipervasculares)	53
Figura 17 – Análise estereológica: volume microvascular	54
Figura 18 – Análise estereológica: extensão microvascular	55

1 INTRODUÇÃO

A angiogênese é o crescimento de novos capilares (1-3). Está fisiologicamente presente durante a fase embrionária e fetal. No adulto, é usualmente ausente, restringindo-se a poucas situações onde representa uma etapa essencial, como na reprodução e cicatrização (4-6). Nestas situações, a angiogênese é um processo ordenado, regulado e autolimitado, resultado do equilíbrio entre fatores estimuladores e inibidores da proliferação vascular. Quando a multiplicação vascular aumenta sem controle, a angiogênese persistente e não-controlada torna-se patológica e sustenta a progressão de muitas doenças não-neoplásicas. Por exemplo, na artrite reumatóide novos capilares invadem e destroem a cartilagem articular; no diabetes mellitus ocorre proliferação de capilares na retina, invasão do vítreo, sangramento e cegueira. A angiogênese associada a tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma neoplásico a partir de células endoteliais pré-existentes (1, 3, 5, 7). Isto promove o crescimento neoplásico através da perfusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos, diferente da simples difusão no espaço extracelular que mantém o tumor restrito e com uma pequena população celular.

No século XIX identificou-se uma rica rede capilar associada ao estroma neoplásica, porém pouco se conhecia sobre a origem dos vasos sanguíneos, a natureza do estímulo a sua formação e a sua relação com o desenvolvimento neoplásico (8). Inicialmente, a hiperemia e o aumento da vascularização foram atribuídos, principalmente, à simples dilatação de vasos pré-existentes, em resposta aos metabólitos e produtos de necrose, sem apresentar efeito direto no tumor. Certos termos como “carcinoma inflamatório”, ainda utilizados atualmente, são baseados nesta concepção errônea (6).

A idéia do crescimento neoplásico dependente da neovascularização originou-se no início dos anos 60, a partir de experimentos *in vitro* onde células tumorais foram inoculadas em órgãos perfundidos isolados (9). Nestes experimentos, artefatos de perfusão levaram a ausência de angiogênese, resultando em restrição do crescimento neoplásico até o diâmetro máximo de 2 a 3 mm. Quando estes pequenos tumores foram transferidos à mesma linhagem do camundongo do qual se originaram desenvolveram neovascularização e cresceram acima de 1000 vezes seu tamanho prévio. A partir destes experimentos, a hipótese proposta foi que não somente as células endoteliais podem limitar a expansão neoplásica, mas que, sem neovascularização, a maioria dos tumores sólidos interrompe seu crescimento quando atinge o diâmetro aproximado de 2 a 3 mm (1, 10).

Em 1971, Folkman *et al.* isolaram um fator em tumores humanos e animais denominado *tumor angiogenesis factor* (TAF) que demonstrou atividade mitogênica às células endoteliais, estimulando a rápida formação de novos capilares em

experimentos animais (11). A partir do isolamento do *TAF*, Folkman *et al.* demonstraram, pioneiramente, que a angiogênese é um pré-requisito para o crescimento neoplásico e não simplesmente um efeito colateral deste, estabelecendo a hipótese que o crescimento neoplásico é angiogênese-dependente: “uma vez que o tumor tenha ocorrido, cada aumento na população celular deve ser precedido pela proliferação de novos vasos capilares, convergindo ao tumor” (1).

Após a identificação do *tumor angiogenesis factor (TAF)* uma série de reguladores positivos da angiogênese, incluindo os peptídeos angiogênicos, também chamados de fatores de crescimento, foram identificados. Dentre estes, os mais encontrados e estudados em tumores humanos são o Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (*bFGF*) – um dos mais potentes peptídeos angiogênicos conhecidos que apresenta importante atividade mitogênica e quimiotóxica para células endoteliais – e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF*). Embora o *VEGF* tenha sido particularmente implicado na angiogênese associada à neoplasia, é provável que a angiogênese *in vivo* seja o resultado da ação de múltiplos fatores angiogênicos (12). Durante a atividade angiogênica, uma ou mais destas proteínas angiogênicas são liberadas pelas células tumorais, difundindo-se através dos tecidos e, alcançando a rede vascular adjacente, desencadeiam uma seqüência de eventos, tais como:

- degradação da membrana basal, usualmente de vênulas pós-capilares adjacentes ao estímulo;
- protrusão e migração celular endotelial através do estroma perivascular em direção ao estímulo angiogênico;

- formação de colunas e, posteriormente, de alças capilares através da intensa proliferação celular, seguida de canalização;

- perfusão sangüínea e deposição de membrana basal (13).

As células tumorais não são a única fonte destas proteínas no estroma neoplásico. O tumor pode recrutar macrófagos, os quais produzem suas próprias proteínas angiogênicas; mastócitos também são recrutados pelo tumor e, repletos com heparina, ampliam o efeito do *bFGF* liberado pelas células tumorais. Além das proteínas angiogênicas liberadas pelas células no estroma neoplásico, o *bFGF*, armazenado na matriz extracelular, também é mobilizado por colagenases ou heparinases, liberadas tanto pelas células tumorais quanto por células não-neoplásicas associadas (figura 1) (6, 13).

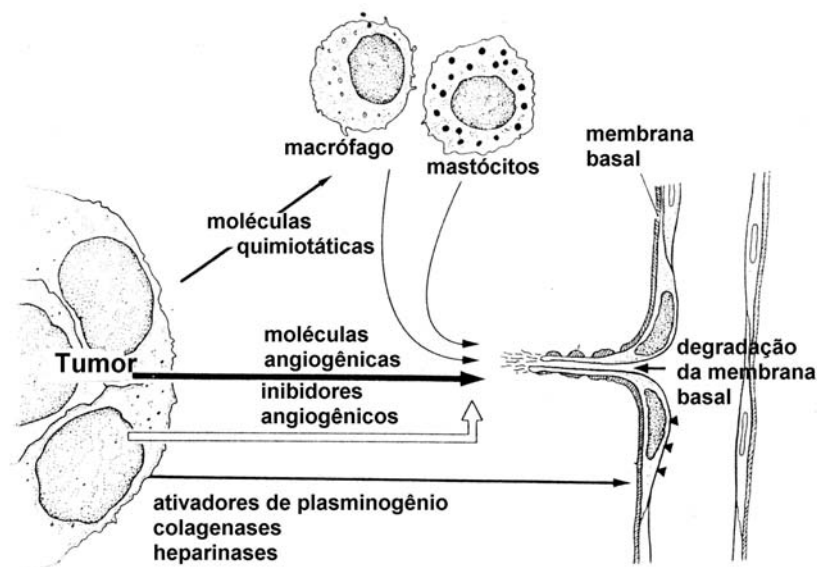


Figura 1 – Angiogênese

Diferentes mecanismos envolvidos na expressão do fenótipo angiogênico e na formação de novos capilares (Adaptado de Folkman *et al.*, 1992) (13).

Recentemente, foi reconhecido que a contribuição da neovascularização ao crescimento neoplásico não é restrita apenas ao efeito de perfusão, mas também ao efeito parácrino. Este resulta da produção de fatores de crescimento pelas células endoteliais que estimulam a migração e proliferação das células tumorais, incluindo fatores de crescimento fibroblásticos, fatores de crescimento ligados à heparina, Fator Estimulador de Clones Granulocitários, Fator de Crescimento Plaquetário-derivado, Fator de Crescimento Tipo Insulina 1 e Interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8). Assim, origina-se uma interação parácrina bidirecional, na qual as células tumorais e endoteliais estimulam mutuamente sua proliferação (6, 13).

A liberação destes fatores de crescimento, isoladamente, não é suficiente para o início da atividade angiogênica. O estímulo angiogênico deve ser acompanhado da supressão dos inibidores locais da angiogênese – os reguladores negativos – que protegem o endotélio vascular do estímulo proliferativo. Diversas proteínas na circulação inibem a proliferação celular endotelial, incluindo o Fator Plaquetário 4 (*PF4*), *Thrombospondin-1*, *TGF- β* , inibidores teciduais das metaloproteinases (*TIMP-1*, *TIMP-2* e *TIMP-3*), Interferon alfa (α -*IFN*), Prolactina (fragmento 16 kDa) e Angiostatina (fragmento 38 kDa do plasminogênio) (6, 13).

A atividade angiogênica em um determinado tumor é um processo complexo, sendo determinada pela quebra no equilíbrio local entre os reguladores positivos e negativos da proliferação microvascular, na qual os negativos são suprimidos (6, 13, 14). A expressão do fenótipo angiogênico, a partir de um subgrupo de células tumorais, demarca duas fases do desenvolvimento neoplásico: (a) pré-vascular e (b) vascular.

Na fase pré-vascular, o diâmetro neoplásico é restrito entre 2 a 3 mm e há limitação da população celular – alguns carcinomas *in situ* contêm menos de 10^6 células. Esta pequena população celular é mantida por difusão de O_2 e nutrientes através do espaço extracelular (1, 2, 15, 16). Estudos experimentais e clínicos demonstram que muitos tumores se originam sem atividade angiogênica, permanecendo *in situ* por um longo período de tempo (meses ou anos). A maioria das lesões pré-vasculares é assintomática e clinicamente indetectável, excetuando-se as localizadas em superfícies como a pele, cavidade oral, cérvix uterina e bexiga. Nesta fase, a ausência de angiogênese impede a expansão do carcinoma *in situ* ou das micrometástases quiescentes, independente da capacidade de replicação celular – há um equilíbrio entre a proliferação e apoptose celular (17, 18).

A fase vascular caracteriza-se pela formação de novos vasos capilares e rápida proliferação celular neoplásica (3, 19). O crescimento neoplásico requer novos capilares e a perfusão passa a ser o mecanismo de aporte de oxigênio, nutrientes e via de eliminação de metabólitos (1). A maioria dos tumores torna-se clinicamente detectável somente após a neovascularização (6). A angiogênese, além de permitir o crescimento do tumor primário, também contribui com o processo metastático. À medida que há expansão da vascularização, maior é a superfície potencial para a invasão de células neoplásicas, o que também pode ser facilitado pela natureza imatura dos novos vasos formados (3, 20).

Em 1972, Brem *et al.* destacaram a importância de definir métodos de quantificação da angiogênese associada à neoplasia, propondo um sistema de graduação em tumores cerebrais baseado nas características das células

endoteliais e na avaliação da densidade microvascular com a utilização de lecitina como marcador do endotélio (21). Posteriormente, novos anticorpos específicos para a detecção das células endoteliais intensificaram os estudos de quantificação da microvascularização associada à neoplasia (22). A primeira evidência da associação entre angiogênese, metástases à distância e diminuição da sobrevida em tumores sólidos humanos foi atribuída a Srivastava *et al.*, em 1986, em estudos no melanoma cutâneo (19). No início dos anos 90, Weidner *et al.* demonstraram a angiogênese como indicador prognóstico nos carcinomas de mama e próstata, a partir da avaliação da densidade microvascular em regiões isoladas com elevada concentração de microvasos (as denominadas áreas hipervasculares ou *hot spots*) em secções histológicas (17, 23, 24). Na última década, esta metodologia tem sido a referência para a avaliação da angiogênese em tumores de mama, próstata e em praticamente todos os tumores sólidos humanos. Evidências recentes também demonstram que a indução da angiogênese na medula óssea sustenta a progressão de neoplasias hematológicas como a leucemia, considerado um “tumor líquido”, e em outras neoplasias mielóides e linfóides (22).

O número de estudos que determinam a angiogênese como fator prognóstico em tumores de mama, pulmão, trato gastrointestinal, geniturinário e pele supera amplamente aqueles que não encontraram tal associação (20, 25, 26). As diferenças encontradas na literatura podem ser atribuídas, dentre diversos fatores, à metodologia de avaliação da microvascularização, à variabilidade na população estudada, critérios histopatológicos, estadiamento da neoplasia, modalidade de tratamento utilizado e à própria heterogeneidade biológica da neoplasia (26). É necessário, além de um delineamento uniforme dos estudos, seguir critérios

padronizados para a identificação e quantificação microvascular, propostos inicialmente por Weidner *et al.* (17, 23, 24) e, posteriormente, uniformizados em dois Consensos Internacionais de metodologia e critérios de avaliação da angiogênese em tumores sólidos humanos publicados em 1996 (27) e 2002 (28).

Os microvasos intratumorais são identificados através da técnica de imunohistoquímica em secções histológicas. A seleção do anticorpo (anti-CD34, anti-CD31, anti-FVIII e CD105) pode influenciar na identificação da microvascularização. O anticorpo anti-CD31 apresenta maior sensibilidade e especificidade, seguido do anti-CD34 e do anti-FVIII. Embora o anticorpo anti-FVIII seja específico para a microvascularização, pode se encontrar ausente em parte do endotélio capilar e, como o anticorpo anti-CD34, apresentar contra-coloração em uma proporção de vasos linfáticos. Embora o anticorpo anti-CD31 possa apresentar reação cruzada com algumas células inflamatórias, tais como células plasmáticas ou estromais, esta reação pode ser discriminada da reatividade celular endotelial com base no padrão de coloração e na morfologia celular (27). Os anticorpos primários utilizados não são equivalentes: o anticorpo anti-FVIII é expresso pelo endotélio estável, enquanto que o anti-CD31 e o anti-CD34 identificam, principalmente, microvasos em crescimento ativo (12). Seguindo-se a identificação da microcirculação é necessária a seleção de áreas representativas na secção histológica. Devido à heterogeneidade encontrada na secção histológica, a quantificação microvascular total implicaria na avaliação de extensas áreas da neoplasia. Conforme critérios propostos, a seleção das áreas representativas na secção histológica inicia-se por microscopia óptica, em pequeno aumento, à procura de áreas com mais intensa neovascularização – as denominadas áreas hipervasculares ou *hot spots* – que se localizam principalmente

na margem neoplásica invasiva (17, 23, 24). A contagem microvascular é realizada nas áreas hipervasculares, pois estas se originam de clones celulares tumorais com o mais alto potencial angiogênico e, conseqüentemente, com maior probabilidade de acesso à circulação sistêmica e de metastatização (28). Uma vez que tais áreas são identificadas, a quantificação é realizada em grande aumento, sendo o resultado expresso pela média entre as áreas hipervasculares (23, 24). Recentemente, incrementos técnicos como a análise digital de imagem tem sido introduzidos. Esta representa um método mais objetivo de quantificação microvascular e permite a redução da variação interobservador encontrada na contagem manual analógica convencional (29).

Neoplasias malignas do trato gastrointestinal, particularmente do cólon e reto, não têm sido extensamente investigadas (30). A maioria dos estudos descritos na literatura, avaliam a angiogênese como um entre os inúmeros candidatos a potenciais fatores prognósticos no carcinoma colorretal, incluindo séries retrospectivas em neoplasias avançadas e com número limitado de pacientes, cuja interpretação dos resultados é freqüentemente prejudicada pelas variações na terapia adjuvante, ausência de padronização e controle de qualidade na metodologia laboratorial e estatística empregadas (29, 31).

A associação da angiogênese com critérios histopatológicos no câncer colorretal demonstrou que o aumento do volume da neoplasia é dependente da angiogênese (32). Fox *et al.* demonstraram que a densidade microvascular se encontra significativamente mais elevada em tecidos histologicamente normais, adjacentes à neoplasia colorretal, conforme a sua progressão (33). Recentemente,

Kuniyasu *et al.* demonstraram que a mucosa hiperplásica adjacente ao adenocarcinoma colorretal apresenta elevada expressão de moléculas pró-angiogênicas, contribuindo para a atividade angiogênica neoplásica e para a intensa vascularização encontrada na transição entre o tecido normal e a margem neoplásica invasiva (34).

Na investigação da angiogênese como fator prognóstico no câncer colorretal, a maioria dos autores demonstrou associação significativa entre elevada microvascularização e redução de sobrevida, através de análise uni- e multivariada (16, 35-47). Por outro lado, outros autores não encontraram tal associação (33, 48-51) e, alguns, até encontraram maior sobrevida em pacientes com tumores de elevada microvascularização por análise uni- e multivariada (20, 52, 53). O delineamento retrospectivo realizado na maioria dos estudos e variações na metodologia, tais como, diferentes marcadores endoteliais, magnificação óptica utilizada, seleção das áreas representativas e a análise de diferentes parâmetros na avaliação da angiogênese podem estar relacionados com a diversidade de resultados. Vermeulen *et al.* realizaram o primeiro estudo prospectivo em carcinoma colorretal e demonstraram que a elevada contagem microvascular foi associada significativamente ao surgimento de metástases hematogênicas e redução da sobrevida, confirmando, assim, os resultados encontrados pela maioria dos estudos retrospectivos previamente realizados (54). Esta diferença de resultados enfatiza a importância de metodologia a ser utilizada e a apropriada seleção dos pacientes, reduzindo a variabilidade intra e interobservador, a fim de obter resultados reproduzíveis e comparáveis.

O papel da angiogênese no desenvolvimento neoplásico precoce, associado à disponibilidade de um modelo de carcinogênese colorretal, baseado em mutações genéticas cumulativas na seqüência pólipó-câncer, levou alguns autores à análise da angiogênese em diferentes fases da carcinogênese colorretal. Bossi *et al.*, estudando 36 adenomas e 178 carcinomas colorretais, encontraram densidade microvascular significativamente mais elevada conforme a progressão neoplásica – mucosa normal, hiperplásica, pólipó adenomatoso e adenocarcinoma. Uma vez estabelecido o adenocarcinoma, não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes estádios. Assim, Bossi *et al.* demonstraram que a angiogênese é estimulada precocemente na carcinogênese, alcançando sua intensidade máxima no adenocarcinoma e que outros mecanismos estariam envolvidos no maior potencial maligno neoplásico e na capacidade de metastatização (48).

Pavlopoulos *et al.*, estudando 106 adenocarcinomas e 17 pólipos adenomatosos colorretais, demonstrou resultados semelhantes. Os adenocarcinomas colorretais apresentaram maior contagem microvascular quando comparados aos adenomas, porém a contagem microvascular reduziu significativamente conforme a progressão neoplásica. Ainda foram incluídos parâmetros morfométricos de avaliação microvascular como a ramificação e área vascular total, demonstrando que tais parâmetros apresentam valores menores nos adenomas e que aumentam significativamente conforme a progressão neoplásica (50).

A primeira análise quantitativa tridimensional da arquitetura microvascular no adenocarcinoma colorretal e em suas lesões precursoras foi realizada por Konerding

et al.. Foram encontradas características arquiteturais microvasculares similares, embora os adenomas tenham apresentado maior preservação da arquitetura vascular (55).

Aotake *et al.* demonstraram que o potencial apoptótico aumentou paralelamente ao incremento da proliferação em adenomas com displasia de baixo grau, mas diminuído quando adenomas progrediram à displasia de alto grau e adenocarcinoma. Um gradual incremento da densidade microvascular foi observado durante a progressão neoplásica na displasia de baixo a alto grau e adenocarcinoma. Houve correlação inversa entre o índice apoptótico e a densidade microvascular quando todas as lesões foram consideradas em conjunto, sugerindo que a angiogênese inicia durante a transição de displasia de baixo a alto grau e que pode contribuir para a redução da apoptose celular durante a carcinogênese colorretal (56).

Conforme a apresentação clínico-patológica, duas vias de carcinogênese colorretal têm sido propostas. A primeira, baseada na seqüência pólipocâncer ou adenoma-carcinoma (57), tem ampla aceitação devido à freqüente coexistência de adenocarcinoma e adenoma na mesma lesão polipóide. O potencial maligno associa-se ao tamanho e extensão do componente adenomatoso do tipo viloso (58-60). A aplicação clínica desta via de carcinogênese representa a base da prevenção secundária do carcinoma colorretal através da polipectomia endoscópica. A segunda, representando uma via alternativa na patogênese do carcinoma colorretal, tem sido extensamente descrita principalmente na literatura japonesa e refere-se ao surgimento do carcinoma colorretal a partir de lesões de padrão de crescimento não-

polipóide. Parte destas lesões seriam constituídas somente de carcinoma invasivo, sem componente adenomatoso associado, sugerindo que a carcinogênese destas lesões seria pela via *de novo*, a partir da mucosa intestinal normal (61, 62).

Desde o relato de um pequeno adenoma não-polipóide por Muto *et al.* (63), e com a progressiva evolução nos sistemas de imagem endoscópica, um número crescente destas lesões tem sido descritas na literatura nas duas últimas décadas, sendo apontadas também como precursoras do carcinoma colorretal (61-64). Morfologicamente são classificadas como plano-elevadas e plano-deprimidas (65-68), sendo, atualmente, incluídas no Sistema de Classificação de Tumores do Sistema Digestivo da Organização Mundial de Saúde (69). Um considerável número destas pequenas lesões podem não ser detectáveis à colonoscopia convencional, sendo identificadas somente através da associação de endoscopia de alta resolução e cromoscopia (70). Endoscopicamente, estas pequenas lesões são reconhecidas por ligeiras alterações de coloração da mucosa (palidez ou discreto enantema) e na textura da parede através de alterações na insuflação aérea. A utilização de contrastes como o índigo carmin facilita a detecção, melhor definição e delimitação destas lesões. Microscopicamente, caracterizam-se pela espessura inferior ao dobro da espessura da mucosa normal adjacente (71, 72).

Apesar das pequenas lesões não-polipóides planas não progredirem rapidamente quando apresentam diâmetro aproximado de 5 mm, algumas destas pequenas lesões podem apresentar um elevado índice de atipia severa apesar de seu pequeno tamanho e devem ser cuidadosamente consideradas (73). A presença de depressão central é considerada um marcador endoscópico de displasia de alto

grau (71, 72). Embora ainda seja tema em discussão (74), diversos estudos indicam um maior potencial maligno destas lesões não-polipóides baseado em suas características histopatológicas (60-68) e o seu papel como precursoras do adenocarcinoma colorretal (75, 76). Kudo (77) demonstrou que neoplasias do tipo deprimido são usualmente menores que as planas e polipóides e apresentam maior risco de displasia de alto grau (aproximadamente 50 % em lesões de 6 a 10 mm) e capacidade de invasão da submucosa enquanto ainda diminutas (diâmetro médio de 11 mm).

O fato de algumas pequenas neoplasias não-polipóides serem constituídas somente de adenocarcinoma, sem componente adenomatoso associado, sugere que a carcinogênese destas lesões seria pela via *de novo*, a partir da mucosa intestinal normal. Isto explicaria, em parte, a maior taxa de crescimento e o comportamento agressivo de algumas destas pequenas lesões (66, 78). Porém, a possibilidade de determinadas lesões originarem-se de pequenos adenomas submetidos à rápida transformação e seguirem a seqüência adenoma-carcinoma, não pode ser ignorada, desde que tecido adenomatoso tem sido ocasionalmente identificado nestas lesões (79).

Avaliando o desenvolvimento e a história natural através de observação colonoscópica (80), cinética celular e mutação K-ras (81) de pequenos adenomas não-polipóides colorretais (diâmetro aproximado de 5 mm) foi demonstrado que estas lesões apresentam progressão lenta, relacionada à cinética celular, e que raramente progridem ao carcinoma invasivo. Estes achados, combinados aos encontrados em estudos retrospectivos prévios, postulam que é possível encontrar

dois tipos de lesões não-polipóides: (a) um que rapidamente progride a via câncer *de novo* sem componente adenomatoso associado e (b) outro que apresenta crescimento exofítico ou permanece morfológicamente inalterado e então poderá evoluir à transformação carcinomatosa lentamente via seqüência adenoma-carcinoma. Mutações de K-ras raramente ocorrem em lesões não-polipóides, sugerindo que o desenvolvimento genético destas lesões difere das lesões polipóides; não foi encontrada diferença significativa na mutação do p53 entre as duas lesões (58). A investigação dos fatores genéticos (especialmente mutações do gene *APC*), análise molecular, angiogênese, fatores do hospedeiro e a resposta imunológica poderão ajudar na elucidação dos fatores envolvidos na diversidade morfológica e no potencial maligno destas lesões. Os escassos estudos referentes à associação da angiogênese com as diferentes apresentações morfológicas de neoplasias colorretais adenomatosas polipóides e não-polipóides demonstraram, até o presente momento, resultados contraditórios em relação ao seu papel determinante na morfologia (82, 83).

Os estudos da angiogênese nos diferentes tumores sólidos humanos, em sua grande maioria, avaliam a densidade microvascular em secções histológicas conforme metodologia proposta por Weidner *et al.* (17, 23, 24) e, portanto, não consideram os diferentes parâmetros morfométricos que poderiam se mostrar significativos, considerando a complexidade tridimensional da microvascularização associada à neoplasia. É possível que parte da diversidade de resultados encontrados nos estudos da angiogênese no carcinoma colorretal seja explicada pelas significativas limitações metodológicas na avaliação da contagem microvascular, habitualmente realizada em secções histológicas em dois planos, a

qual é influenciada pela tortuosidade, compressão e emaranhamento da microcirculação (47).

Há muito tempo vem sendo reconhecidas as potenciais vantagens da morfometria em relação à observação visual, tanto em histopatologia quanto em citologia. A medição de tecidos e células, quando comparada à observação visual tem como principais vantagens a maior objetividade e mais fácil reprodutibilidade. A morfometria dos tecidos foi utilizada, inicialmente, para a compreensão da morfologia tridimensional e fisiologia teciduais, sendo posteriormente preconizada em pesquisa na área de patologia como um meio para melhorar os métodos diagnósticos convencionais. Atualmente, suas aplicações são numerosas. Através dela, pode-se estudar áreas, superfícies, volumes e formas. Este método vem sendo aplicado em estudos de patologia mamária, ovariana e em neoplasias vesicais para avaliação e graduação das neoplasias (84) O termo morfometria foi definido inicialmente como a descrição quantitativa de uma estrutura e, posteriormente, como morfologia quantitativa a medição de estruturas por qualquer método, incluindo a estereologia (85).

Conforme demonstrado por Gil *et al.* (86), em consequência da secção histológica, há uma redução dimensional: um volume tridimensional torna-se uma área em dois planos e uma superfície em dois planos torna-se uma linha em um único plano. Em uma secção histológica a representação do núcleo, por exemplo, resulta em um perfil nuclear, onde a área do perfil nuclear representa o volume nuclear original (a área é o “traço” do volume); a extensão do perímetro do perfil representa a superfície nuclear (o contorno ou perímetro é o “traço” da superfície

nuclear) e a secção de uma fibra neural é reduzida a um ponto (o ponto é o “traço” da linha) (figura 2) (86-88).

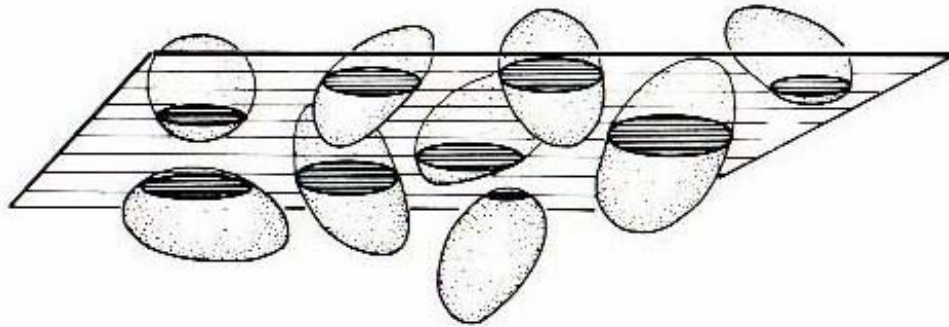


Figura 2 – Princípios da estereologia

Objetos aleatoriamente seccionados, demonstrando o tracejado na secção em dois planos e a estrutura original tridimensional correspondente: o volume é representado pela área e a superfície por uma linha (Adaptado de Gil *et al.*)(86).

Neste contexto, a morfometria é definida somente como a mensuração dos “traços” e a estereologia, a ciência de mensurações válidas em três dimensões (86). Quando é analisado o suprimento vascular em um determinado tumor e não células isoladas, a falta de correlação direta entre a imagem obtida em único plano e a morfologia tridimensional limita a representatividade da secção obtida e a simples quantificação das estruturas realizada (86). Os métodos estereológicos são ferramentas precisas para a obtenção de informações quantitativas tridimensionais acerca de estruturas microscópicas, baseadas, principalmente, nas observações feitas nas secções histológicas. A estereologia é apoiada em probabilidade geométrica, permitindo observação em três dimensões, como o volume e extensão, a partir de imagens bidimensionais (86-88). A partir da relação quantitativa existente entre as dimensões do tecido no seu perfil e em 3 dimensões, a estereologia permite

a correlação das dimensões dos traços com as dimensões dos objetos que estes representam. Portanto, a partir da medição das áreas dos perfis nucleares pode-se inferir as dimensões do volume nuclear original com a aplicação de fórmulas estereológicas a um número suficiente de áreas. A morfologia irregular de vários órgãos ou de estruturas (córtex adrenal, córtex cerebral, suprimento vascular) dificulta uma estimativa confiável de seus respectivos volumes. Isto foi resolvido pela aplicação de incrementos da técnica estereológica e da metodologia proposta por Cavalieri que permitem a determinação do volume absoluto a partir de secções verticais em intervalos conhecidos (espessura da secção) (87, 88).

A estereologia foi inicialmente descrita em 1847 pelo geólogo francês August Delesse. Posteriormente, com a introdução da morfologia matemática foi possível a aplicação da análise de imagem computadorizada em larga escala à estereologia. A partir dos anos 80, um número crescente de avanços técnicos tem sido obtidos ampliando o uso da estereologia em aplicações biológicas (86).

A capacidade de converter sinais analógicos para o formato digital tornou possível a representação de imagens ópticas como matrizes de valores de densidade óptica, o que trouxe a mudança fundamental na área: o começo da análise de imagens digitais em videomicroscopia. A análise da imagem digital consiste no uso de computadores para derivar a informação numérica relacionada às características da imagem selecionada, tais como perímetros, áreas, densidades ópticas e outras (84).

O avanço da técnica computadorizada tem permitido a realização de medidas rápidas e automáticas de diferentes tecidos com aplicações práticas em

patologia laboratorial (89). O computador tem condições de calcular as dimensões, o número de objetos e armazená-los digitalmente. Porém, tanto as medidas, quanto a rigorosa seleção das áreas de interesse, devem ser realizadas cuidadosamente, a fim de se evitar desvios (90).

A associação da análise estereológica à quantificação microvascular foi realizada previamente em poucos estudos sobre pólipos colorretais benignos e carcinoma colorretal (47, 50, 91, 92). Contudo, os escassos estudos avaliando a angiogênese em lesões colorretais não-polipóides a analisam somente através da quantificação (82, 83), não sendo encontrada descrição na literatura, até o presente momento, de análise estereológica nestas lesões

A possibilidade de abordagem dos múltiplos fatores envolvidos no processo angiogênico e a análise de diferentes metodologias para a sua determinação, tornam amplo o campo de pesquisa e de avanços que podem ser obtidos na avaliação da angiogênese associada à neoplasia. Neste estudo, através da análise digital de imagem e estereologia, serão avaliados parâmetros tridimensionais, além da quantificação microvascular bidimensional, nas diferentes apresentações morfológicas dos adenomas colorretais e no adenocarcinoma colorretal restrito à submucosa, a fim de determinar o papel da angiogênese nas diferentes etapas da seqüência adenoma-carcinoma e sua relação com as diferentes apresentações das lesões precursoras do carcinoma colorretal.

2 OBJETIVOS

Utilizando a avaliação da quantificação microvascular e estereologia por análise digital de imagem:

- a) Verificar diferenças da angiogênese entre os adenomas colorretais polipóides e não-polipóides.
- b) Verificar diferenças da angiogênese entre os adenomas polipóides e o adenocarcinoma colorretal restrito à submucosa.
- c) Comparar a quantificação microvascular e estereologia por análise digital de imagem como metodologias de avaliação da angiogênese na neoplasia colorretal.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento

Estudo histórico de delineamento transversal.

3.2 Material

Foram incluídas neste estudo 115 lesões neoplásicas colorretais, ressecadas endoscópica ou cirurgicamente no período de 1997 a 2001, obtidas de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Fundação Universitária de Gastroenterologia (FUGAST). Foram selecionados blocos de parafina contendo os espécimes ressecados, fixados previamente em formalina 10 % e submetidos à secção de 4 μ m, com posterior fixação e montagem em lâmina de vidro e coloração com hematoxilina-eosina. A amostra foi dividida em 36 pólipos com displasia de baixo grau (PDBG), 27 pólipos com displasia de alto grau (PDAG), 13 pólipos com adenocarcinoma restrito à submucosa (CASM), 27 lesões não-polipóides com displasia de baixo grau (NPDBG) e 12 lesões não-polipóides com displasia de alto grau (NPDAG).

3.3 Tamanho amostral

Considerando que a variável angiogênese é medida em uma escala quantitativa e que seu desvio padrão é de aproximadamente 20 unidades (56, 82), para testar diferenças de pelo menos 20 unidades (tamanho do efeito = 1), estima-se um tamanho amostral de aproximadamente 23 pacientes por grupo, para $\alpha = 0,05$ e poder = 90%.

3.4 Critérios de classificação macroscópica e histopatológica das lesões colorretais

Todas as secções histológicas foram submetidas à revisão microscópica pelo patologista e pesquisador, sem o conhecimento prévio das características morfológicas e histopatológicas da lesão, a fim de uniformização de critérios diagnósticos.

A classificação macroscópica e histopatológica das lesões colorretais obedeceu a critérios publicados em 2000 para classificação de tumores pela Organização Mundial de Saúde (69). Os adenomas colorretais foram definidos pela presença de neoplasia intraepitelial, histologicamente caracterizada pela hiper celularidade, núcleos aumentados e hipercromáticos com variados graus de estratificação e perda da polaridade. Macroscopicamente foram classificados em polipóides e não-polipóides (figuras 3 e 4). Conforme critérios propostos por Kudo (67), a caracterização endoscópica das lesões colorretais não-polipóides baseia-se no padrão de crescimento ligeiramente elevado em relação à mucosa adjacente, com coloração discretamente avermelhada ou palidez circunscrita e associadas à

interrupção dos sulcos inominados da mucosa colorretal. A associação com cromoendoscopia, através da instilação do contraste índigo carmin 0,4 %, permitiu melhor definição destas lesões, incluindo sua superfície, morfologia e limites. Microscopicamente, sua espessura não ultrapassa duas vezes a espessura da mucosa normal adjacente (71, 72) (figura 5).

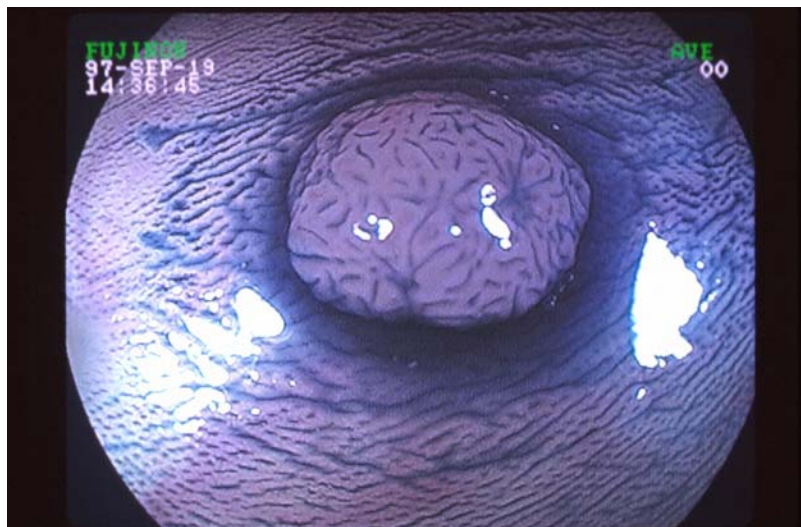


Figura 3 – Adenoma colorretal polipóide

Videocolonosopia com magnificação de imagem (FUJINON, 40X) associada à cromoscopia com índigo carmin.

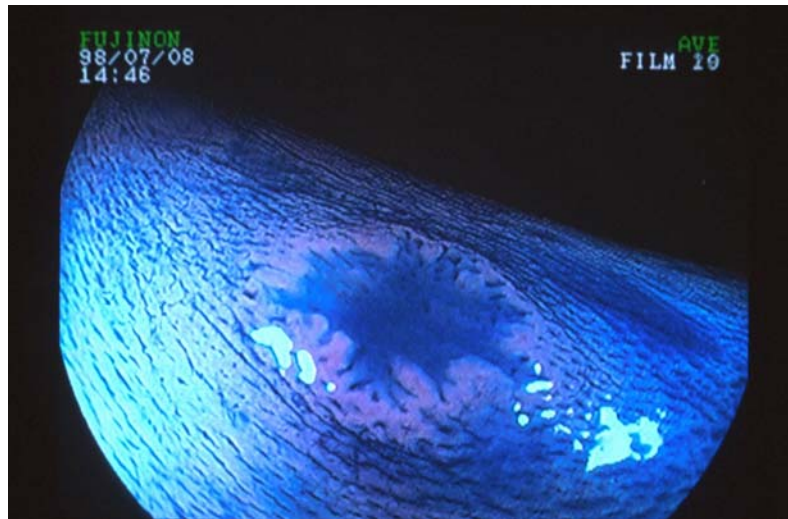


Figura 4 – Adenoma colorretal não-polipóide

Videocolonoscopia com magnificação de imagem (FUJINON, 40X) associada à cromoscopia com índigo carmin



Figura 5 – Adenoma colorretal não-polipóide: secção histológica

Espessura da lesão inferior ao dobro da mucosa adjacente (HE, 125 X).

Baseado em sua arquitetura microscópica os adenomas foram subdivididos em tubular, túbulo-vilosos e vilosos. Em relação ao grau de displasia foram classificados em adenomas com displasia de baixo grau (agrupando displasia leve e moderada) e displasia de alto grau (93, 94). Os adenomas com displasia de baixo

grau foram caracterizados pela arquitetura glandular pouco alterada e com mínimas atipias nucleares (núcleos ligeiramente aumentados, pseudoestratificados e com preservação da polaridade) (figura 6). Adenomas demonstrando maiores alterações na arquitetura glandular e atipia nuclear moderada a acentuada (núcleos aumentados, hipercromáticos, irregulares e ocupando o terço superior da glândula), restritas ao epitélio ou à lâmina própria, foram classificados como adenomas com displasia de alto grau (figura 7).

O adenocarcinoma colorretal foi definido pela presença de invasão da submucosa (69) (figura 8).



Figura 6 – Adenoma colorretal com displasia de baixo grau.
Preservação da arquitetura glandular e mínimas atipias nucleares (HE, 50X).

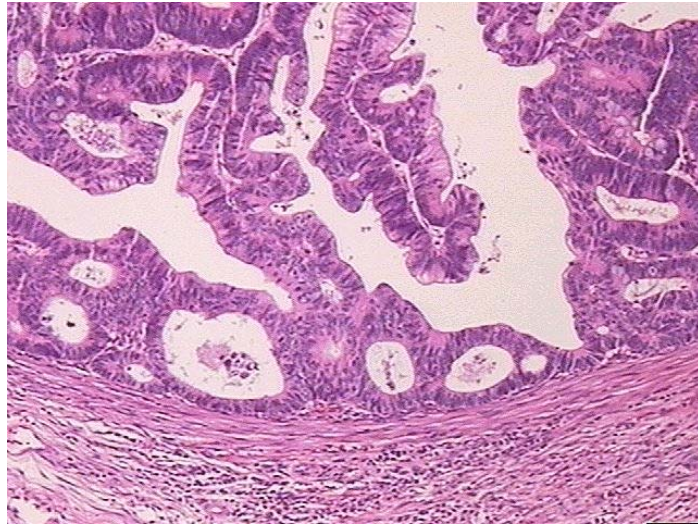


Figura 7– Adenoma colorretal com displasia de alto grau.
Distorção acentuada da arquitetura glandular e atipias nucleares, com preservação da muscular da mucosa (HE, 50 X).

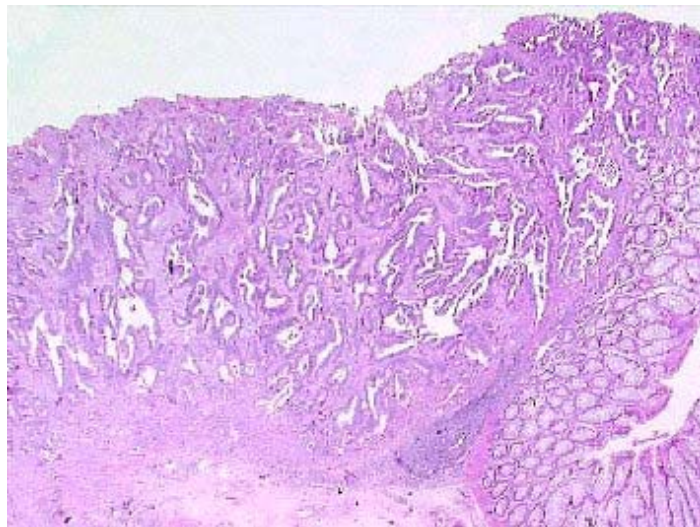


Figura 8 – Adenocarcinoma colorretal
Lesão com invasão da submucosa, adjacente à mucosa normal (HE, 50X).

3.5 Imuno-histoquímica

A microvascularização foi identificada por imuno-histoquímica, conforme técnica previamente descrita (95), utilizando o anticorpo endotelial primário anti-

CD31 (*Monoclonal Mouse Anti-Human Endothelial Cell, CD31 Clone JC/70A Code n° M0823 Lot 070 Edition 16.07.99 DAKO A/S – Denmark*) em secções histológicas desparafinadas. O complexo estreptoavidina-biotina – DAKO StrepAB (*Large Volume DAKO LSAB+Kit, Peroxidase Universal K0690 DAKO CORPORATION Carpinteria, CA 93013 USA*) foi utilizado para a visualização da imunorreação, utilizando-se o DAB-diaminobenzidina tetra-hidrocloroeto como cromógeno (*DAKO DAB Chromogen tablets, DAKO A/S, Denmark*) e contra-coloração com hematoxilina de Harris. Histologicamente, os microvasos foram reconhecidos pela coloração acastanhada, contrastando com a contra-coloração de fundo de cor azul (hematoxilina de Harris), representando os controles positivos para a reação imunohistoquímica com o anti-CD31 (figura 9). Os controles negativos omitiram o anticorpo primário (anti-CD31), substituindo-o por solução salina. Isto permite avaliar a coloração inespecífica que, caso esteja presente, indica que o complexo secundário anticorpo-biotina apresenta reação cruzada com alguma(s) substância(s) endógena(s), comprometendo, portando, a acurácia do método. A técnica de imunohistoquímica empregada neste estudo foi realizada no Laboratório Medicina Digital (Porto Alegre – RS).

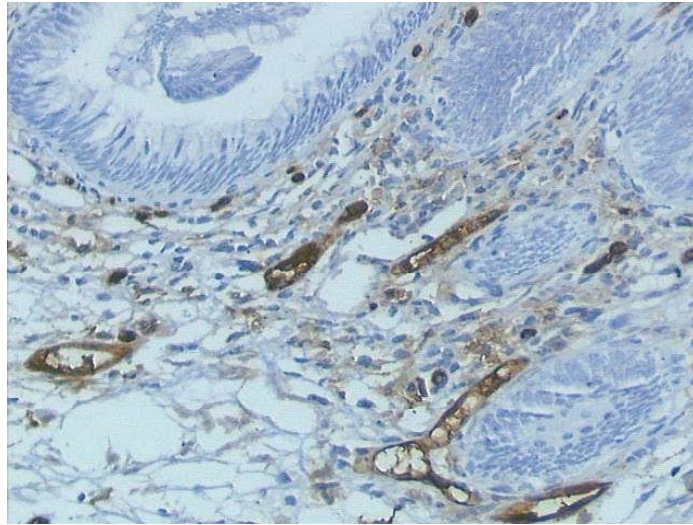


Figura 9 – Imuno-histoquímica: anticorpo anti-CD 31

Microvasos de cor castanha contrastando com a cor de fundo azul (hematoxilina de Harris) (HE, 200 X).

3.6 Análise digital de imagem e quantificação microvascular

As lâminas foram analisadas pelo pesquisador sem o conhecimento prévio da classificação histopatológica das secções. Foi utilizado sistema de análise digital de imagem composto por microscópio óptico Olympus BX60 (Tóquio, Japão) com lentes planacromáticas neofluares (SWH10X-H/26,5) conectado através de videocâmera (SONY[®] model DXC-970MD 3CCD – *color video camera*) ao microcomputador com processador *Pentium* II 400 MHz com 128 MB de memória RAM, disco rígido de 13 GB e placa de captura *Image Pro Capture kit* (*Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*). Para análise estereológica digital foram utilizados os programas *Image Pro Plus* versão 4.5 e *Scion Image for Windows* 2000 (96) que permitem a captura digital de imagem com as áreas de interesse, marcação de estruturas, utilização de recursos gráficos e posterior gravação em CD. A captura

das imagens foi realizada na Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Inicialmente, cada secção histológica foi analisada completamente em 40 aumentos (UPLANFI 4x/0,13 ∞ /-) com o objetivo de reconhecer com clareza a área neoplásica a ser estudada, bem como a possibilidade de coloração excessiva de fundo (*background*) ou outros artefatos (figura 10). Conforme descrito inicialmente por Weidner *et al.* (17, 23, 24) e ratificado em Consensos Internacionais de metodologia de avaliação da angiogênese em tumores sólidos humanos (27, 28), as áreas hipervasculares são selecionadas em 100 aumentos (UPLANFI 10x/0,30Ph1 ∞ /-) a partir da concentração do maior número de microvasos corados pelo anticorpo anti-CD31 (figura 11).

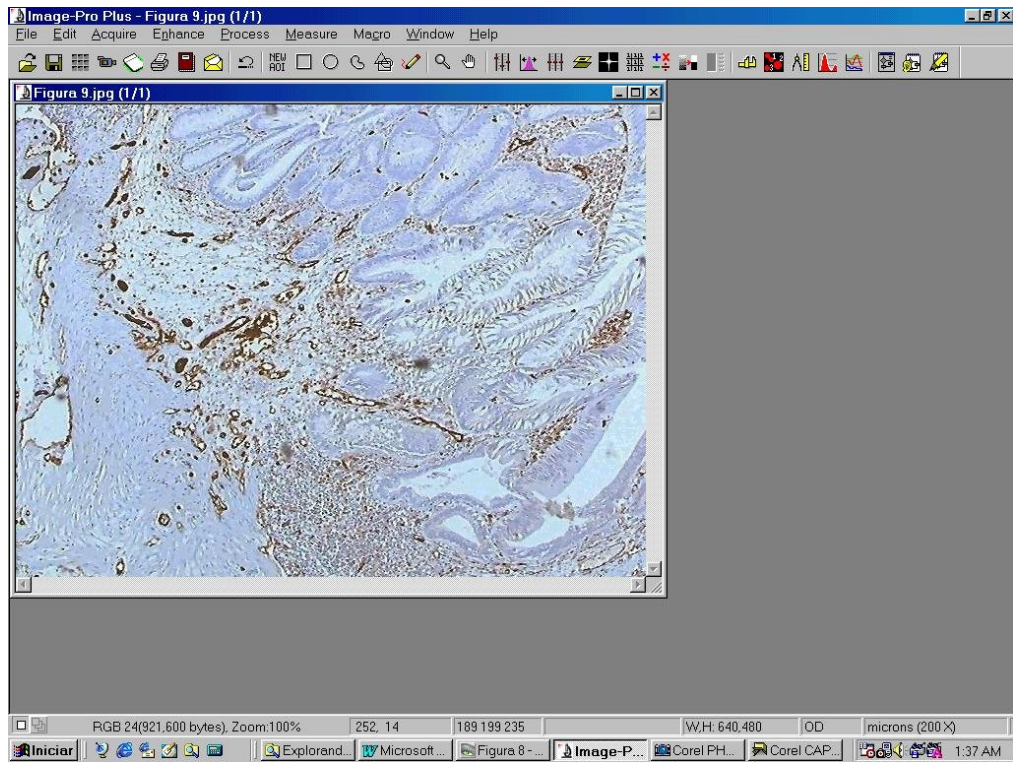


Figura 10 – Captura digital de imagem

Imagem capturada com a utilização do programa *Image Pro Plus* versão 4.5 e análise inicial da secção histológica (imuno-histoquímica anti-CD31, 40X).

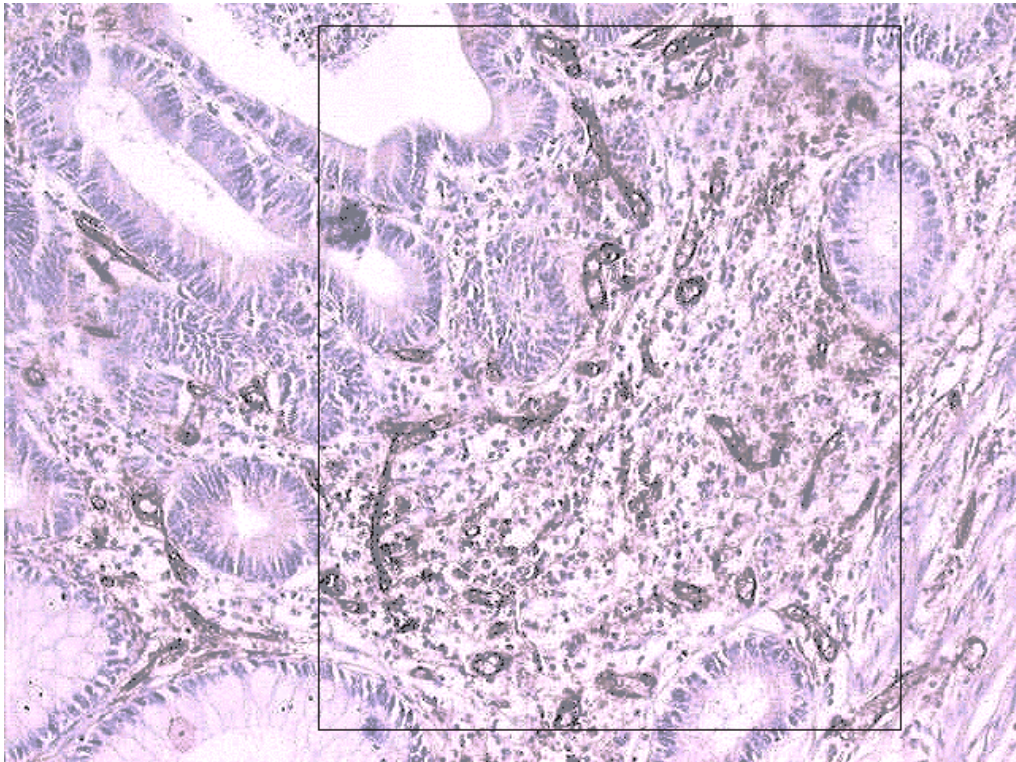


Figura 11 – Seleção da área hipervascular

Captura digital de imagem com identificação de área hipervascular a partir da concentração de microvasos corados (imuno-histoquímica anti-CD 31, 100X).

Posteriormente, cada área hipervascular foi analisada em 200 aumentos (UPLANFI 20x/0.50Ph1 ∞ /0,17). Qualquer célula ou grupamento celular demonstrando coloração positiva (coloração acastanhada), claramente isolada de vasos maiores adjacentes, células tumorais e outros elementos do tecido conjuntivo, com ou sem lúmen e/ou eritrócitos foi considerado um microvaso contável. Áreas com fibrose, hemorragia, necrose, inflamação, microvasos esparsos e vasos com parede muscular foram excluídos da contagem (17, 27) (figura 12). A quantificação, estimativa do volume e extensão microvascular nestas áreas foi realizada através do

método de contagem estereológica com correção por grade a seguir descrito (87, 88).

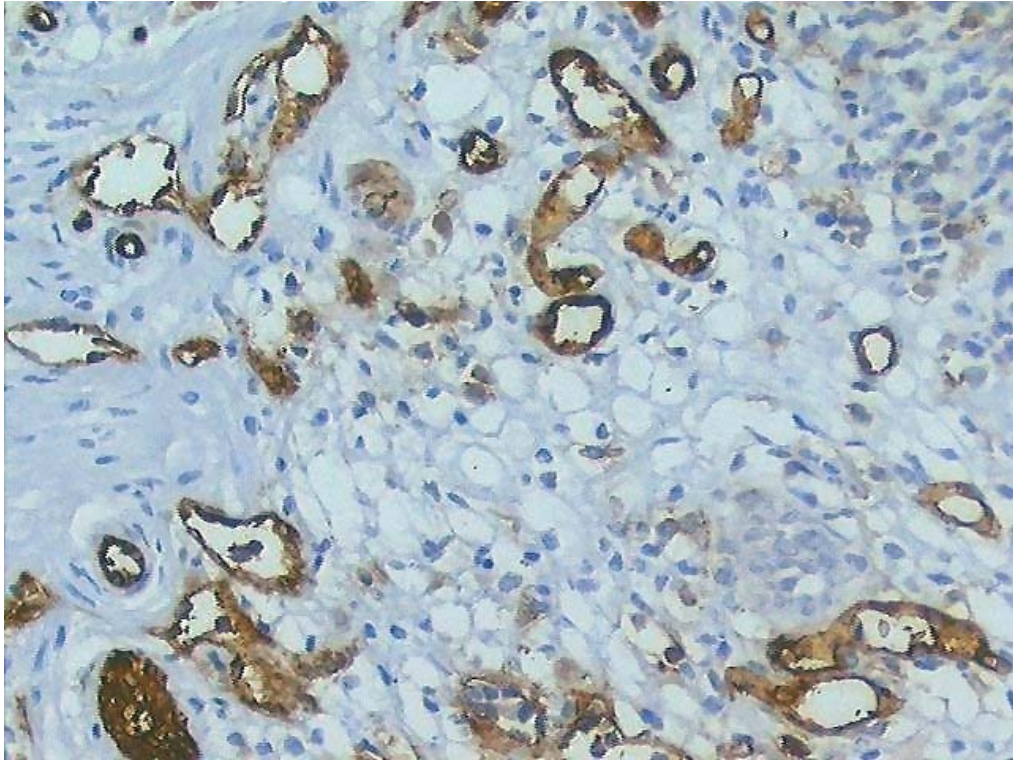


Figura 12 – Microvasos contáveis em área hipervascular segmentada

Nas áreas hipervasculares segmentadas são considerados microvasos contáveis qualquer célula ou grupamento celular demonstrando coloração positiva (coloração acastanhada), isolada de vasos maiores adjacentes, células tumorais e outros elementos do tecido conjuntivo, com ou sem lúmen e/ou eritrócitos; microvasos esparsos e vasos com parede muscular foram excluídos da contagem (imunohistoquímica anti-CD31, 200X).

A imagem capturada em formato *.jpg* (*joint photography experts group*) contendo as áreas de interesse foi convertida ao formato *.tif* (*true image format*) através do programa *IrfanView version 3.7* e, posteriormente, armazenada em formato *.bmp* (*bitmap file*). Isto permitiu a inserção da grade de correção estereológica e a marcação com pontos das estruturas microvasculares, com o

auxílio dos programas *Scion Image for Windows 2000* e *Image Pro Plus* versão 4.5. A inserção da grade de correção resulta em um campo com amplitude de 600 x 440 pixels, correspondendo à área de 0,66 mm² em 200 aumentos. Somente foram considerados como contáveis os microvasos incluídos completamente dentro da grade, ou que toquem a linha de demarcação da mesma (figura 13). A contagem microvascular foi objetivamente graduada em uma escala ordinal, expressa pelo número de microvasos por área hipervascular (se presente somente uma área) ou pela média aritmética das áreas identificadas na secção histológica.

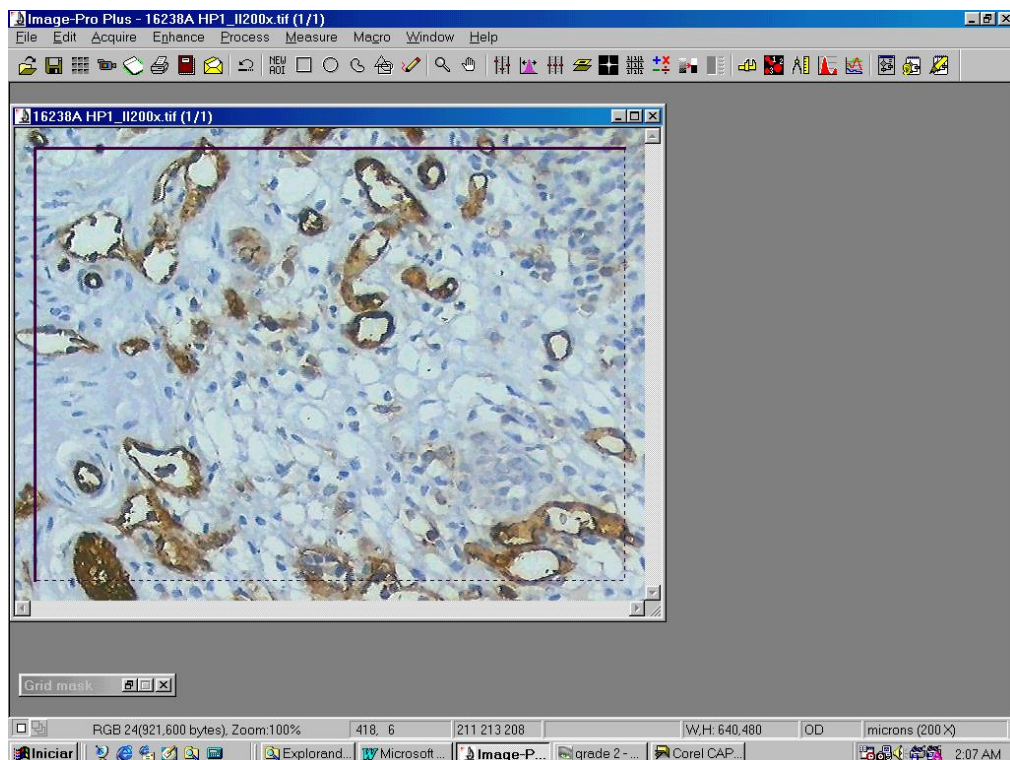


Figura 13 – Segmentação digital da área hipervascular

Quantificação e análise estereológica microvascular a partir da inserção da grade de correção estereológica bidimensional, considerando-se como microvasos contáveis somente aqueles incluídos dentro da grade ou que toquem a linha de demarcação. Amplitude de campo = 600 x 440 pixels; área = 0,66 mm² (Imuno-histoquímica, anti-CD31, 200X).

3.7 Estereologia nas lesões neoplásicas colorretais

A estereologia é o conjunto de técnicas usadas para a obtenção de informações quantitativas sobre características geométricas com sistemas de testes de dimensão menor que o objeto ou estrutura estudado (84). A base matemática para a estimativa de volume das formas irregulares foi dada pelo matemático italiano Cavalieri (86, 87) que demonstrou que o volume **V(obj)** de qualquer objeto pode ser estimado a partir de secções paralelas separadas por uma distancia conhecida **t**,

somando-se as áreas de todas as secções cruzadas do objeto $\Sigma a(\text{prof})$ e multiplicando esta figura por t : $V(\text{obj}) = t \cdot \Sigma a(\text{prof})$.

Como é impossível medir uma estrutura com absoluta precisão, a medida média da espessura (t) das fatias do corte pode ser estimada pela medida do comprimento daquilo que se está medindo, omitindo-se a primeira e a última fatia e dividindo-se pelo número total de fatias menos 2. Em toda a superfície do corte, em todas as secções aplica-se um teste randomizado com pontos regularmente distribuídos. No estudo realizado, foi sobreposta grade com pontos distribuídos aleatoriamente e com intervalos fixos entre si (amplitude de campo de 600 x 440 pixels com 17 x 9 pontos) à imagem capturada contendo a área de interesse (figura 14). Para cada estrutura sob estudo, contam-se todos os pontos P que os alcançam. Assim, a área absoluta de uma secção da estrutura é $a(\text{sect}) = a(p) \cdot P(\text{struc}) u^2$, onde $a(p)$ é a área em unidades conhecidas ao quadrado (u^2), associada com cada ponto no sistema de teste regular. O volume total de cada estrutura é estimado após a adição de todos os pontos que alcançam a estrutura.

$$V(\text{estrut}) = t \cdot a(p) \cdot \Sigma P(\text{estrut}) u^3$$

O “calculador” de Cavalieri é um instrumento valioso, pois permite obter facilmente na avaliação estereológica padrão uma estimativa do volume do espaço de referência.

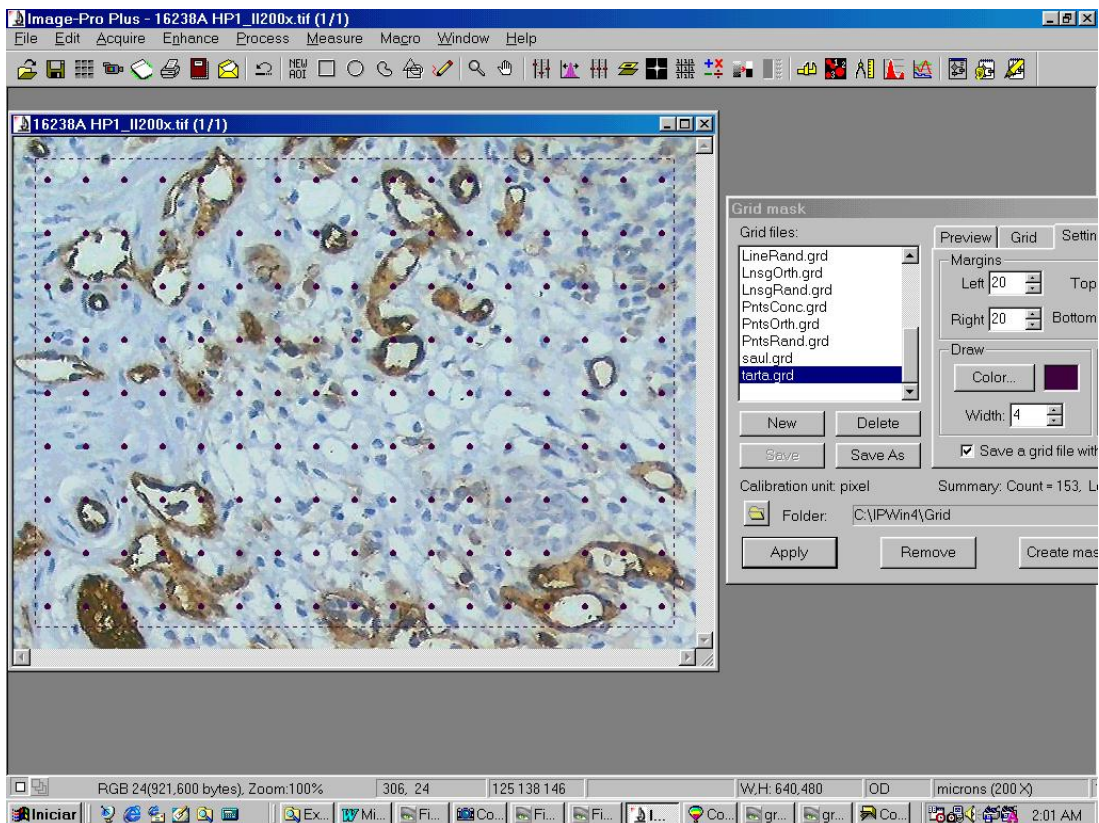


Figura 14 – Análise estereológica

Sobreposição de grade com pontos de distribuição aleatória (amplitude de campo de 600 x 440 pixels; 17 x 9 pontos; área = 0,66 mm²) para estimativa de volume e extensão microvascular.

A probabilidade que uma determinada estrutura atingida por uma secção aleatoriamente posicionada e orientada seja proporcional a sua dimensão linear ou extensão, confere uma estimativa deste parâmetro de avaliação microvascular. A partir da quantificação do número de pontos P que atingem as estruturas de interesse em uma determinada área hipervascular e do volume pode-se aplicar a seguinte fórmula para a estimativa da extensão microvascular:

$$L(\text{struct}) = 2 \cdot Q_A(\text{struct} / \text{ref}) \cdot V(\text{ref}) u,$$
 onde a densidade numérica Q_A é estimada pelo número de pontos P , conforme descrito acima..

3.8 Análise estatística

Os dados referentes às variáveis quantitativas, número de microvasos totais e número de microvasos/área hipervascular foram descritos por mediana e amplitude interquartil (P25 a P75) devido à forte assimetria observada na distribuição de freqüências. Para a comparação estatística dos grupos foram utilizadas as transformações matemáticas *rank* e logarítmica, sendo em seguida aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) *oneway*. A localização de diferenças por teste de comparações múltiplas (procedimento de *post hoc*) foi realizada pelo teste de Duncan. Como os achados obtidos foram muito semelhantes, optou-se por apresentar os resultados da transformação logarítmica. Os dados submetidos à transformação logarítmica também foram analisados pela técnica de regressão linear, o que possibilitou a avaliação de tendências lineares do fenômeno da angiogênese entre os grupos estudados. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados com o auxílio do *Statistical Package for the Social Sciences – SPSS* versão 11.0.

3.9 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA (GPPG) sob o número 99-330, ano de 1999, obtendo financiamento parcial do Fundo de Amparo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE).

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação microvascular absoluta (número de microvasos)

A avaliação da contagem microvascular nas secções histológicas dos adenomas e adenocarcinoma colorretal restrito à submucosa, demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos na ANOVA *oneway* ($P < 0,001$). Foram identificados três estratos de acordo com o número de microvasos: baixo, médio e elevado. Ao analisar estes dados utilizando um modelo de regressão, foi possível identificar uma clara tendência linear, indicando que à medida que progride o grau de displasia e crescimento polipóide aumenta, de forma estatisticamente significativa, o número de microvasos da lesão ($P < 0,001$) (tabela 1 e figura 15).

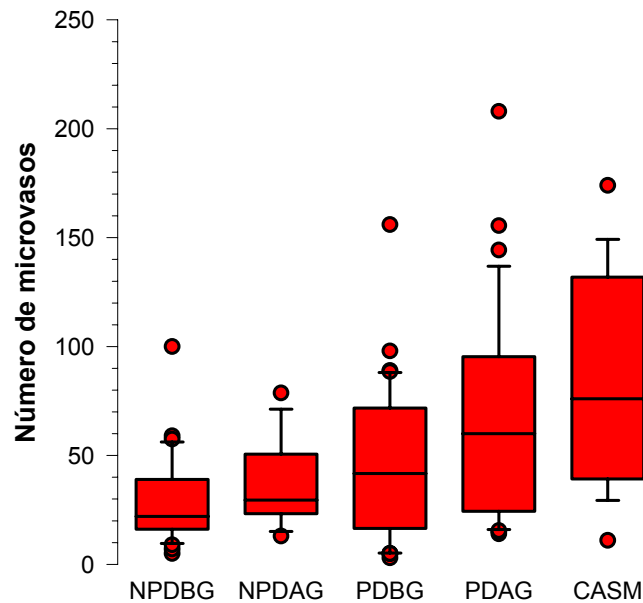


Figura 15 – Quantificação microvascular absoluta

Diferentes apresentações macroscópicas e graus de displasia dos adenomas colorretais e carcinoma colorretal restrito à submucosa (ANOVA *oneway*, $P < 0,001$). NPDBG: adenoma não-polipóide com displasia de baixo grau; NPDAG: adenoma não-polipóide com displasia de alto grau; PDBG: adenoma polipóide com displasia de baixo grau; PDAG: adenoma polipóide com displasia de alto grau; CASM: carcinoma de submucosa polipóide.

4.2 Quantificação microvascular relativa (microvasos/área hipervascular)

Quanto ao número de microvasos por área hipervascular o teste de ANOVA *oneway* não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Somente no modelo de regressão observou-se, novamente, uma tendência linear significativa ($P = 0,012$) (tabela 1 e figura 16).

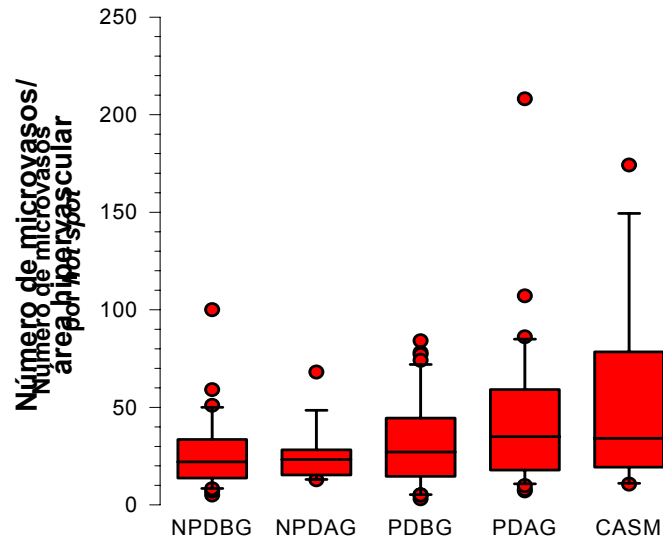


Figura 16 – Quantificação microvascular relativa (número de microvasos/área hipervascular)

Diferentes apresentações macroscópicas e graus de displasia dos adenomas colorretais e carcinoma colorretal restrito à submucosa (ANOVA *oneway*, $P = 0,012$). NPDBG: adenoma não-polipóide com displasia de baixo grau; NPDAG: adenoma não-polipóide com displasia de alto grau; PDBG: adenoma polipóide com displasia de baixo grau; PDAG: adenoma polipóide com displasia de alto grau; CASM: carcinoma de submucosa polipóide.

4.3 Análise estereológica (volume e extensão microvascular)

A análise estereológica microvascular demonstrou que tanto o volume quanto a extensão microvascular repetiram o padrão observado para o número de microvasos (contagem absoluta de microvasos). Porém, ao comparar-se os parâmetros estereológicos entre lesões com displasia de alto grau, estes se mostraram significativamente mais elevados nas lesões polipóides em relação às não-polipóides ($P < 0,001$). Assim, foi possível observar-se uma tendência

estatisticamente significativa para o aumento desses indicadores conforme a progressão da displasia, morfologia polipóide e malignidade ($P < 0,001$) (tabela 1 e figuras 17 e 18).

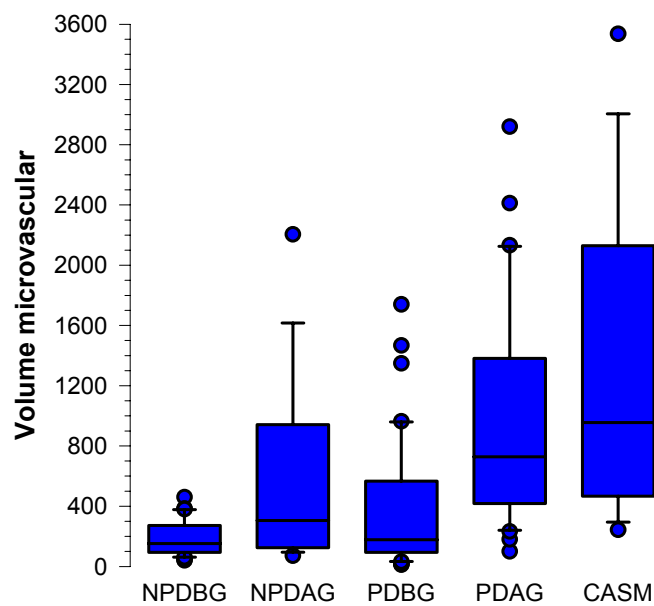


Figura 17 – Análise estereológica: volume microvascular

Associação entre a progressão do volume microvascular com a morfologia polipóide, displasia de alto grau e no adenocarcinoma restrito à submucosa (ANOVA *oneway*, $P < 0,001$). NPDBG: adenoma não-polipóide com displasia de baixo grau; NPDAG: adenoma não-polipóide com displasia de alto grau; PDBG: adenoma polipóide com displasia de baixo grau; PDAG: adenoma polipóide com displasia de alto grau; CASM: carcinoma de submucosa polipóide.

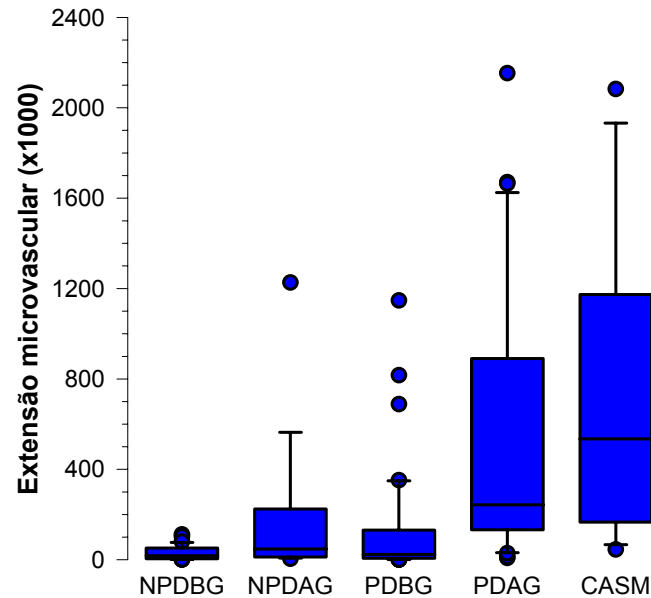


Figura 18 – Análise estereológica: extensão microvascular

Associação entre a progressão da extensão microvascular com a morfologia polipóide, displasia de alto grau e no adenocarcinoma restrito à submucosa (ANOVA *oneway*, $P < 0,001$). NPDBG: adenoma não-polipóide com displasia de baixo grau; NPDAG: adenoma não-polipóide com displasia de alto grau; PDBG: adenoma polipóide com displasia de baixo grau; PDAG: adenoma polipóide com displasia de alto grau; CASM: carcinoma de submucosa polipóide.

Tabela 1: Comparação dos valores obtidos pela quantificação, volume e extensão microvascular entre os grupos em estudo

Variável	NPDBG n=27	NPDAG n=12	PDBG n=36	PDAG n=27	CASM n=13	P
Microvasos	22,0 ^a (16,0 - 40,0)	29,5 ^{a,b} (22,1 - 50,6)	41,8 ^{a,b} (15,8 - 71,9)	60,0 ^{b,c} (23,0 - 95,6)	76,0 ^c (37,5 - 132,6)	<0,001
Microvasos/área hipervasacular	22,0 (13,0 - 34,0)	23,1 (14,9 - 29,1)	27,0 (14,3 - 44,4)	34,9 (17,7 - 59,0)	34,0 (17,9 - 80,5)	0,122
Volume microvascular	152 ^a (92 - 248)	306 ^{a,b} (118 - 997)	178 ^b (93 - 601)	728 ^c (416 - 1408)	956 ^c (436 - 2188)	<0,001
Extensão microvascular [‡]	17,5 ^a (4,4 - 54,7)	47,4 ^b (10,6 - 243,6)	24,0 ^{a,b} (6,5 - 142,2)	242,4 ^c (131,1 - 936,8)	534,6 ^c (146,7 - 1262,4)	<0,001

Os dados são descritos como mediana e amplitude interquartil (P25 a P75). Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas ao teste *de post hoc* de Duncan, aplicado após análise de variância de um critério (ANOVA *oneway*). NPDBG: adenoma não-polipóide com displasia de baixo grau; NPDAG: adenoma não-polipóide com displasia de alto grau; PDBG: adenoma polipóide com displasia de baixo grau; PDAG: adenoma polipóide com displasia de alto grau; CASM: carcinoma de submucosa polipóide; ‡ extensão microvascular x 1000.

5 DISCUSSÃO

A angiogênese desempenha um papel fundamental no desenvolvimento neoplásico. Qualquer aumento da população celular deve ser precedido por um aumento do suprimento vascular, a fim de fornecer oxigênio e nutrientes. Durante a fase pré-vascular o equilíbrio entre os fatores pró- e inibidores da angiogênese resulta em restrição do crescimento neoplásico ao diâmetro aproximado de 2 a 3 mm (1, 10).

Apesar da relevância da angiogênese no desenvolvimento neoplásico demonstrada por Folkman *et al.* (1) há mais de 3 décadas e do crescente número de publicações na literatura mundial – a revisão no *MEDLINE (National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA)* com a palavra chave *angiogenesis* demonstra a presença de 3780 publicações de janeiro a novembro de 2003 –, ainda são encontrados resultados controversos em relação ao seu valor prognóstico. Estes podem ser atribuídos, entre diversos fatores, às diferenças na metodologia de avaliação microvascular (17, 27, 97), associadas à heterogeneidade biológica neoplásica e, semelhante a outros marcadores tumorais, à heterogeneidade vascular neoplásica (98, 99).

Variações metodológicas podem estar associadas à diversidade de resultados encontrados. Desta forma, neste trabalho, foi realizada a avaliação da

angiogênese em secções histológicas das diferentes formas de apresentação morfológica dos adenomas e do adenocarcinoma colorretal restrito à submucosa através da combinação de duas técnicas, associadas à quantificação microvascular: a análise digital de imagem e estereologia. A revisão do *MEDLINE* até outubro de 2003 não mostrou nenhum artigo avaliando a angiogênese através de estereologia e análise digital de imagem nas diferentes formas de apresentações morfológicas dos adenomas colorretais. Isto se deve, provavelmente, a importância restrita à análise crítica e detalhamento da metodologia de avaliação da angiogênese associada à neoplasia encontrada na literatura.

Diversos mecanismos têm sido implicados na ativação angiogênica em tumores, incluindo estresse metabólico (baixa concentração local de O₂, redução do pH e hipoglicemia), estresse mecânico (pressão gerada pela proliferação celular), resposta imune/inflamatória e mutações genéticas (ativação de oncogenes ou deleção de genes supressores tumorais que controlam a produção de reguladores da angiogênese) (100-102). Apesar de não estar completamente elucidado o papel dos fatores ambientais e/ou genéticos na ativação angiogênica e no crescimento neoplásico, a ativação angiogênica tem sido observada em estágios pré-malignos em diversas neoplasias humanas (18, 102, 103). Isto foi demonstrado por Folkman *et al.* em 1989, em modelos experimentais de tumores pancreáticos em ratos que seguiram a seqüência hiperplasia-neoplasia (18), nos quais a angiogênese antecedeu e foi necessária para a progressão de hiperplasia à neoplasia. A presença de densa neovascularização no carcinoma mamário intraductal e na neoplasia cervical intraepitelial também sugere que a angiogênese esteja associada precocemente à progressão neoplásica (104-106).

Os adenomas colorretais originam-se através do incremento da atividade proliferativa, a qual, por sua vez, ativa a apoptose pela carência de nutrientes e competição por fatores de crescimento resultantes da proliferação celular. Isto determina o lento crescimento dos adenomas apesar da elevada atividade proliferativa. Na presença de alterações de ambos os mecanismos, o efeito sinérgico do incremento da proliferação e inibição da apoptose resulta em rápido crescimento dos adenomas e, subseqüentemente, dos carcinomas colorretais (56).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que a angiogênese foi estimulada precocemente durante a tumorigênese e que a formação de novos vasos ocorreu antes do início da malignidade em lesões polipóides. A quantificação microvascular foi progressivamente mais elevada nas lesões com displasia de alto grau comparadas às de baixo grau. Quanto maior o grau de atipia observado, maior foi o número de microvasos (regressão linear, $P < 0,05$).

A análise de parâmetros obtidos pela análise estereológica demonstrou diferenças entre os estádios da progressão da neoplasia colorretal, resultando em aumento no volume e extensão microvascular nas lesões com displasia de alto grau comparadas às de baixo grau. Estes achados sugerem que a angiogênese é um evento precoce na carcinogênese colorretal e que antecede o surgimento do adenocarcinoma. A presença de importantes alterações estruturais na arquitetura glandular restritas à mucosa e a presença de pleomorfismo nuclear – que definem a displasia de alto grau – foram suficientes para o desencadeamento do processo angiogênico. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Aotake *et al.* (56), embora Bossi *et al.* (48) não tenham encontrado diferença na quantificação

entre lesões polipóides com displasia de baixo e alto grau ao utilizarem somente como metodologia de avaliação angiogênica a avaliação de densidade microvascular.

Neste estudo, concomitante à quantificação microvascular progressivamente mais elevada na progressão neoplásica polipóide, o volume e a extensão microvascular foram mais elevados nas lesões polipóides contendo adenocarcinoma restrito à submucosa em relação às lesões com displasia de baixo grau. Assim, estes dados confirmam a hipótese que a angiogênese é um evento precoce na carcinogênese colorretal. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Bossi *et al.* (48) e Aotake *et al.* (56) que utilizaram a avaliação da densidade microvascular, e Pavlopoulos *et al.* (50) que associaram a avaliação morfométrica em imagens digitais à avaliação da densidade microvascular.

A angiogênese também desempenha um importante papel – juntamente com fatores envolvidos na degradação da membrana basal e matriz extracelular, tais como o sistema plasmina-plasminogênio, as metaloproteinases de matriz e as catepsinas – na capacidade de invasão transmural (107). Tumores que se tornam vascularizados expressam níveis aumentados de proteínas pró-angiogênicas como o Fator de Crescimento Endotelial Derivado de Plaquetas (108) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (109). O Fator de Crescimento Endotelial Vascular também contribui na invasão transmural por apresentar função antiapoptótica – através da indução de expressão *bcl-2*, ativação do *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e inibição do *c-jun-NH3-kinase* (JNK) – e capacidade de degradar a matriz

extracelular, através da ativação da plasminogênio-uroquinase e de seu sistema receptor (110, 111).

A relação da angiogênese com metástases linfonodais no adenocarcinoma colorretal restrito à submucosa e o seu papel na possível indicação de ressecção endoscópica exclusiva foi estudada por Oh-e *et al.* (83). A quantificação microvascular realizada em 254 carcinomas com invasão de submucosa demonstrou que lesões ressecadas apresentando baixa contagem microvascular e com invasão de submucosa inferior a 1,5 μm não apresentam metástases linfonodais, indiferente do grau de diferenciação histológica. Isto possibilitaria a extensão das indicações de ressecção com finalidade curativa nestes casos, embora a presença de indiferenciação histológica na margem invasiva ainda seja considerada o fator de risco mais importante para o surgimento destas metástases.

A angiogênese associada à neoplasia é um processo caótico e irregular (102), resultando em vasos funcionalmente anormais, de diâmetros variados, com excessivas ramificações, distorções estruturais e alterações na parede, tais como fenestrações endoteliais, ampliação das junções interendoteliais e defeitos na membrana basal (8). Apesar da riqueza morfológica encontrada nesta complexa arquitetura tridimensional, o número de publicações relacionadas que analisam a morfologia tridimensional é pequeno (47, 50, 91, 92).

Apesar do seu reconhecido papel na carcinogênese colorretal, a partir de suas características histopatológicas, o elevado potencial maligno das lesões não-polipóides ainda é matéria em discussão na literatura (74). Provavelmente, o

seguimento e a melhor definição das alterações genéticas destas pequenas lesões poderá determinar sua história natural e o real potencial maligno (81, 112). Embora dois estudos retrospectivos (113, 114) e dois prospectivos (80, 81) tenham demonstrado que tumores não-polipóides progridem lentamente quando comparados aos polipóides, relatos da história natural de diminutas lesões colorretais ainda são muito escassos e o mecanismo de desenvolvimento destas lesões ainda permanece desconhecido. Por outro lado, Fujimori *et al.* demonstraram que a incidência de displasia acentuada e carcinoma foi significativamente maior nas lesões não-polipóides em relação às polipóides, sugerindo que estas lesões apresentam comportamento biológico mais agressivo (73). Ikegami também sugeriu que lesões não-polipóides apresentam características diferentes daquelas encontradas nas lesões polipóides, incluindo a capacidade de invasão de submucosa enquanto ainda se apresentam de diminuto tamanho (62).

No presente estudo, ao se comparar as diferentes apresentações morfológicas dos adenomas colorretais, não foi encontrada diferença na quantificação microvascular entre as lesões polipóides e não-polipóides, indiferente do grau de displasia. Contudo, a análise estereológica conseguiu detectar valores mais elevados nas lesões polipóides com displasia de alto grau em relação às não-polipóides com displasia de alto grau. As diferenças encontradas com a análise estereológica podem ser o resultado da capacidade de detecção da heterogeneidade tridimensional microvascular através desta metodologia. Não estão completamente elucidados os mecanismos responsáveis pelas duas diferentes vias de desenvolvimento neoplásico e a resultante heterogeneidade de apresentações morfológicas. Conforme os resultados obtidos neste estudo, a angiogênese não

parece ser o fator determinante da apresentação morfológica. Achados semelhantes foram descritos recentemente por Oh-e *et al.* (83). Por outro lado, Rubio (82) demonstrou que o colágeno e a microvascularização encontram-se mais elevados nos adenomas polipóides em relação aos não-polipóides, sugerindo que os primeiros necessitam maior suporte vascular para sustentar seu crescimento exofítico. Apesar de serem desconhecidos os mecanismos pelos quais as lesões não-polipóides apresentam menor expressão microvascular quando comparadas às polipóides, nossos achados podem sustentar, em parte, os achados descritos por Watari *et al.* (81) e Aotake *et al.* (56). Os resultados obtidos por estes autores, após o seguimento de diminutas lesões não-polipóides, demonstram que somente uma pequena parte destas lesões apresentam rápido crescimento e progressão ao câncer invasivo e que um número significativo destas permanece morfológicamente inalterado ou apresenta evolução morfológica polipóide de lenta progressão. A baixa quantificação angiogênica encontrada nas diminutas lesões não-polipóides pode estar associada àquelas lesões que não apresentam progressão morfológica e, assim, representar um melhor comportamento biológico e necessidade de aporte vascular restrito. No estudo realizado, os resultados encontrados sugerem que a presença de displasia de alto grau seja um evento mais significativo em relação à morfologia macroscópica na determinação do potencial angiogênico.

Apesar da intensa pesquisa para a identificação dos determinantes moleculares e de inibidores naturais e sintéticos da angiogênese (115, 116), pouco é conhecido em relação à natureza do leito vascular em tumores humanos e a melhor maneira de avaliá-lo (117). Em vista dos resultados controversos encontrados em determinados estudos referentes ao papel da angiogênese como fator prognóstico e

que utilizam a metodologia inicialmente proposta por Weidner *et al.* (17, 23, 24), recentemente, questões foram levantadas em relação à aplicação desta metodologia devido a sua baixa reprodutibilidade, resultado, principalmente, da intervenção humana na seleção das áreas hipervasculares e identificação dos microvasos.

Na análise da angiogênese em secções histológicas o ponto mais crítico permanece sendo a seleção dos campos a serem analisados (118). O princípio baseia-se na seleção, em pequeno aumento, de áreas com maior concentração de microvasos na secção histológica – as denominadas áreas hipervasculares. Realizando a contagem microvascular bidimensional nestas áreas, determina-se o escore angiogênico (17, 23, 24). Variações na técnica de imuno-histoquímica, a utilização de diferentes anticorpos primários e de métodos de recuperação antigênica – que apresentam diferentes graus de especificidade – podem resultar em alterações na identificação destas áreas e, conseqüentemente, dos seus microvasos (27). Ainda, áreas hemorrágicas ou inflamatórias, comumente observadas em carcinomas colorretais avançados, podem levar a uma contagem microvascular erroneamente elevada e, portanto, devem ser excluídas das áreas contáveis (50). Em outras condições, tais como em tumores intensamente vascularizados e em diminutas lesões não-polipóides, como as encontradas no presente estudo, a identificação uniforme destas áreas hipervasculares é de difícil realização.

A técnica de contagem microvascular manual realizada em grande aumento nas hipervasculares, é trabalhosa, demanda tempo e requer constante atenção, o que pode resultar em significativas variações interobservador e baixa reprodutibilidade, tornando muitas vezes difícil as comparações entre os diferentes

estudos. A diversidade de equipamentos ópticos utilizados, com diferentes amplitudes de campo e de magnificação microscópica, também influenciam na avaliação da área estudada e na confiabilidade dos parâmetros analisados (119). Weidner *et al.* (17) demonstraram que o valor preditivo da densidade microvascular decresce quando a área analisada é inferior a $0,19 \text{ mm}^2$. Embora Weidner *et al.* (23) tenham sugerido um campo de $0,74 \text{ mm}^2$, estudos da angiogênese no câncer de mama apresentam amplas variações na magnificação e área utilizadas, encontrando-se valores entre $0,12$ e 1 mm^2 . Uma pequena área, correspondendo a maior magnificação, melhora o detalhamento da imagem e permite a identificação de um número maior de microvasos, enquanto que em áreas maiores há certa “diluição” na área hipervascular (27, 120). Vermeulen *et al.* (121) observaram que a magnificação em 400x resulta em contagem duas vezes maior em relação à realizada em 200x em secções de neoplasia de mama submetidas à imunohistoquímica com anti-CD31.

Outros autores têm escolhido como metodologia a amostragem de campos sobre toda a secção histológica (122). É ainda desconhecido se a quantificação obtida nas áreas mais vascularizadas é mais significativa e representa a mesma informação biológica que a média obtida de toda a secção histológica (118).

Recentemente, determinadas variações na metodologia de avaliação da angiogênese têm sido publicadas, destacando-se a descrita por Fox *et al.* (123) em 1994. Estes autores descreveram um método alternativo de quantificação angiogênica, utilizando a grade de Chalkley (124) que se constitui em uma grade reticulada com 25 pontos aleatoriamente distribuídos (*point-counting eyepiece*

graticulate) e sobreposta às áreas hipervasculares. Foram avaliados 30 carcinomas de mama e a contagem de Chalkley foi o resultado do número de pontos da grade que atingem os microvasos, obtida pela média entre três áreas de contagem. Houve correlação positiva ($r = 0,71$) entre a avaliação da densidade microvascular e a contagem de Chalkley.

Apesar das terminologias avaliação da densidade microvascular e contagem de Chalkley serem utilizados freqüentemente como sinônimo na literatura, estes não são métodos equivalentes, uma vez que a contagem de Chalkley representa uma estimativa da área vascular relativa ao invés de uma verdadeira contagem microvascular (12, 28, 125). Como método de morfometria vascular, a contagem de Chalkley é potencialmente examinador-dependente, embora exclua uma das variabilidades importantes que se refere à distinção entre duas estruturas coradas adjacentes (se representam um único ou dois microvasos separados) (28, 125).

Posteriormente, a investigação do valor prognóstico da angiogênese, avaliada através da contagem de Chalkley, foi realizada em estudos no carcinoma de mama (120, 126-129), no carcinoma de pulmão de não-pequenas células (130-133) e no carcinoma de bexiga (7, 134). No carcinoma de mama, somente dois estudos demonstraram contagem elevada de Chalkley como fator prognóstico adverso independente através da análise multivariada (120, 127). No carcinoma de pulmão de não-pequenas células dois estudos demonstraram contagem de Chalkley elevada associada ao prognóstico adverso (131, 132). No carcinoma de bexiga ambos estudos encontraram associação entre a contagem elevada de Chalkley e o prognóstico adverso (7, 134). Assim, em virtude das diferenças encontradas, o

impacto prognóstico da avaliação da angiogênese com a utilização desta metodologia não se encontra claramente definido (125).

Offersen *et al.* (125) apresentaram uma comparação entre dois métodos de avaliação da angiogênese: a avaliação da densidade microvascular e a contagem de Chalkley. Analisando 977 carcinomas reunidos em cinco de seus estudos publicados previamente e que utilizaram metodologia proposta por Gundersen *et al.* (87), com o emprego da grade de correção estereológica, foi demonstrada moderada correlação entre as duas metodologias, embora o impacto prognóstico tenha apresentado diferenças conforme o tipo de carcinoma. Somente no carcinoma de próstata a densidade microvascular demonstrou superioridade à contagem de Chalkley em separar dois grupos de pacientes e como marcador prognóstico independente na análise multivariada (135, 136). No carcinoma de mama, a contagem de Chalkley foi superior à avaliação da densidade microvascular na análise univariada; na análise multivariada a contagem de Chalkley serviu como marcador independente somente em pacientes com linfonodos positivos. Em pacientes com linfonodos negativos não foi possível a discriminação entre grupos de baixo e alto risco com a utilização da contagem de Chalkley (125). No carcinoma de pulmão nenhum dos métodos de contagem demonstrou valor prognóstico e a angiogênese, aparentemente, não é fundamental para o desenvolvimento deste tipo de tumor (130). No carcinoma de bexiga, a quantificação microvascular elevada, demonstrada por ambos os métodos, associou-se ao prognóstico favorável e ao grau de inflamação presente (137).

Portanto, a afirmativa de padronizar a contagem de Chalkley como método de avaliação angiogênica, publicada em dois Consensos Internacionais de

metodologia e critérios de avaliação da angiogênese em tumores sólidos humanos (27, 28) não encontra suporte na literatura devido a falta de informações prognósticas consistentes com a sua utilização. Isto pode estar associado a problemas metodológicos que devem ser solucionados antes da implementação deste método na prática clínico-patológica diária.

Com base em estudos realizados que demonstram a superioridade da aplicação das imagens computadorizadas digitalizadas na análise morfométrica quantitativa (84), acrescentando maior objetividade e eficácia quando comparado ao método analógico convencional, avaliou-se a angiogênese nas secções histológicas através da análise digital de imagem. Em nosso estudo esta técnica se mostrou efetiva e precisa na segmentação de áreas analisadas, sem sobreposição de campos, o que representou um importante avanço técnico, pois em determinadas secções histológicas foram realizadas até 20 segmentações em uma única área área hipervasculares. Esta técnica também permitiu o armazenamento das imagens para análise e comparação posteriores. Para a sua execução não foi necessária a utilização de equipamento de alto custo, sendo utilizado microscópio óptico, computador, placa de captura de imagem e programas de processamento de imagem com recursos para a execução de análise estereológica que podem ser obtidos pela internet. O emprego do programa de análise estereológica *Scion Image* possibilitou a inserção e formatação de recursos gráficos – como a grade de correção estereológica – na imagem digitalizada que permitiram a análise estereológica. Com isto acrescentou-se um maior número de informações na avaliação da angiogênese. A técnica analógica utilizada na grande maioria dos estudos de angiogênese não permite o armazenamento das imagens, sendo

necessária a avaliação imediata dos parâmetros em estudo e há maior dificuldade e custo para a inserção de dispositivos como a grade de correção estereológica. Ao ser empregada metodologia estereológica bidimensional, através da inserção da grade de correção proposta por Gundersen *et al.* (87) nas imagens digitalizadas, realizou-se a quantificação microvascular sem o habitual viés de contagem observado nos estudos em que a contagem foi realizada incluindo-se todo o campo microscópico. Foram considerados microvasos contáveis somente aqueles incluídos na área estabelecida pela grade de correção. Isto tem como objetivo evitar a inclusão de estruturas cujos limites estariam além do campo analisado e, assim, poderiam não estar relacionadas a microvasos contáveis ou, como habitualmente ocorre, quantificá-las repetidamente em dois campos segmentados adjacentes, resultando em uma quantificação erroneamente mais elevada. Embora a análise digital de imagem tenha contribuído para aprimorar a seleção das áreas hipervasculares e uniformização da avaliação angiogênica, é ainda sujeita à intervenção humana com algum grau de subjetividade tanto na seleção das áreas hipervasculares como na identificação dos microvasos. Apesar do significativo ganho de qualidade na avaliação angiogênica com a utilização da análise digital de imagem e a grade de correção estereológica, poucos estudos utilizaram estas metodologias (50, 125).

É importante considerar que os resultados obtidos em um único plano pela metodologia convencional de análise da angiogênese (17) embora provenientes de secções escolhidas como as mais representativas da área neoplásica, não consideram a complexidade e a heterogeneidade da arquitetura microvascular. Conforme demonstrado por Gil *et al.* (86), em consequência da secção há uma

redução dimensional: um volume tridimensional torna-se uma área em dois planos e uma superfície em dois planos torna-se uma linha em um único plano. Portanto, os resultados tornam-se dependentes do tamanho e da forma da área hipervasculares definida pela secção, uma vez que esta nem sempre contém o campo com o maior número de microvasos.

Neste estudo, a variação intra-neoplásica foi eliminada através da avaliação estereológica da superfície vascular que reflete a geometria vascular das áreas hipervasculares selecionadas em cada secção histológica. Esta metodologia demonstrou superioridade em relação à quantificação microvascular bidimensional na detecção de diferenças entre as lesões polipóides com displasia de alto e baixo grau e entre as lesões polipóides e não-polipóides com displasia de alto grau. O método estereológico baseia-se no fato que secções em dois planos contêm informações quantitativas sobre estruturas tridimensionais. As estimativas resultantes da análise estereológica são completamente independentes da orientação das secções e da forma do objeto, sendo as proporções mantidas independentemente da magnificação utilizada (87). Isto acrescenta maior efetividade e reprodutibilidade quando comparado a quantificação microvascular bidimensional como único parâmetro de avaliação da angiogênese. Semelhante à aplicação da grade reticulada de Chalkley, a aplicação da grade com pontos de distribuição aleatória elimina o viés de decisão observador-dependente se duas estruturas coradas representam um único ou dois microvasos separados. Determinados autores sugeriram que além da quantificação microvascular, a área vascular (50, 120, 138, 139) e a estimativa computadorizada da extensão endotelial (140) total deveriam ser consideradas como importantes parâmetros na avaliação angiogênica.

Métodos de processamento automático de imagens obtidas de toda a secção neoplásica têm permitido a seleção objetiva das áreas hipervasculares e a contagem microvascular sem a possibilidade de intervenção humana (97, 118, 122, 139, 141, 142). Através de completa automação com a utilização de captura de imagem por microscópio automatizado (97, 142) ou com *scanner* fotográfico de *slide* (118), obtém-se a quantificação objetiva dos microvasos. Algumas dificuldades encontradas na maior aplicabilidade destes métodos são: a disponibilidade do equipamento necessário, a resolução do sistema de imagem e a necessidade de utilização de métodos de intensificação da coloração imuno-histoquímica para que todos os microvasos presentes na secção neoplásica sejam identificados (97). Por outro lado, estruturas em áreas com *background* excessivo podem ser erroneamente incluídas como microvasos contáveis se não forem previamente excluídas. Com a aplicação destes métodos, a possibilidade da densidade microvascular ser alterada pela imperfeita segmentação dos microvasos deve ser considerada, uma vez que podem ser agregados microvasos adjacentes ou um microvaso relativamente extenso pode ser separado em diversos fragmentos. Embora o método manual possa quantificá-los como um único microvaso, a análise automatizada, pode quantificá-los separadamente. Além disto, os resultados obtidos são também dependentes do tamanho e da forma das áreas hipervasculares.

A complexidade da angiogênese associada à neoplasia é demonstrada: (1) pela presença de mecanismos alternativos em determinados tumores sólidos em que os vasos sanguíneos não são derivados necessariamente do brotamento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, (2) pela variabilidade biológica da angiogênese entre os diferentes tipos de tecidos e tumores e (3) pela possibilidade

de obtenção de diferentes resultados conforme o parâmetro utilizado na sua avaliação. A estimativa mais objetiva da angiogênese permitirá sua reprodutibilidade entre os diferentes centros de pesquisa e tratamento de neoplasias, podendo torná-la um elemento adicional importante no exame histopatológico das ressecções tumorais e um importante fator prognóstico quantitativo na avaliação de rotina dos tumores conforme sugerido por Brem *et al.* em 1972 (21).

Os dados apresentados demonstram a importância da aplicação de métodos que avaliem a morfologia tridimensional que é característica da angiogênese. Neste estudo, a utilização da estereologia possibilitou a análise de parâmetros que representam a complexidade arquitetural da microvascularização, além da seleção mais objetiva das áreas hipervasculares com a inclusão da análise digital de imagem. Considerando a diversidade de resultados encontrados com a avaliação da angiogênese que utilizam somente a metodologia convencional de avaliação da densidade microvascular bidimensional e, atualmente, com a possibilidade de utilização de métodos automáticos e computadorizados, a análise da quantificação microvascular, isoladamente, pode representar um parâmetro incompleto de avaliação da angiogênese.

Apesar da relativa complexidade na aplicação de fórmulas matemáticas para execução do cálculo de variáveis estereológicas e da necessidade de equipamento disponível para captura e análise digital de imagem, a combinação de ambas as técnicas se mostrou efetiva na segmentação e melhora na qualidade das imagens, permitindo, através da reprodução da característica tridimensional do suprimento

vascular neoplásico, a identificação de diferenças na microvascularização nas etapas evolutivas do câncer colorretal.

6 CONCLUSÕES

Utilizando a avaliação da quantificação microvascular e estereologia por análise digital de imagem:

- a) Não foram encontradas diferenças significativas na angiogênese entre lesões adenomatosas colorretais polipóides e não-polipóides.
- b) Foi encontrada associação significativa entre o incremento da quantificação microvascular e a progressão da displasia e carcinoma invasivo de submucosa nas lesões polipóides colorretais, porém entre as lesões adenomatosas com displasia de alto e baixo grau somente a análise estereológica detectou diferenças estatisticamente significativas.
- c) Através da análise digital de imagem, a estereologia se mostrou superior em relação à quantificação microvascular por representar a morfologia tridimensional característica do suprimento vascular e detectar diferenças significativas nas etapas precoces da neoplasia colorretal.

7 PERSPECTIVAS

Na última década, o leito vascular neoplásico tem sido extensamente estudado através de diferentes técnicas de avaliação de densidade microvascular, utilizando marcadores celulares pan-endoteliais que refletem o *status* vascular do tecido, ou seja a presença de vasos sanguíneos. Através desta metodologia não obtemos informações do *status* angiogênico do leito vascular neoplásico (dinâmica do processo angiogênico), e funcional da vascularização neoplásica (117). Recentes estudos histomorfológicos indicam que alguns tumores podem estar vascularizados sem significativa angiogênese, provavelmente por utilizar vascularização pré-existente ou mesmo por formar canais vasculares através de processo não-endotelial (143, 144). Uma vez que a densidade microvascular apresenta variações conforme a neoplasia e metodologia empregada, a realização de estudos que utilizem marcadores associados à atividade angiogênica como o CD105 (145), determinadas integrinas associadas à proliferação endotelial (119), a verificação do *status* funcional da neovascularização através da quantificação de células murais como pericitos e células musculares lisas e a investigação de fatores como o VEGF, Fator indutor de hipóxia 1 α (12), entre outros, permitirá um melhor conhecimento do grau de ativação da angiogênese e do *status* funcional da vascularização neoplásica. Isto permitirá, provavelmente, a melhor seleção de pacientes portadores

de neoplasias com elevada intensidade angiogênica e com potencial benefício da terapêutica antiangiogênica (117).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
2. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82(1):4-6.
3. Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, et al. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994;74(8):2245-50.
4. Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1997;77(1):253-60.
5. Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* 1976;36(8):2807-12.
6. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333(26):1757-63.
7. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994;74(6):762-6.
8. Shubik P. Vascularization of tumors: a review. *J Cancer Res Clin Oncol* 1982;103(3):211-26.
9. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* 1966;164(3):491-502.
10. Gimbrone MA, Jr., Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature* 1969;221(188):33-6.
11. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133(2):275-88.
12. Boyle J. Histological measurement of tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2003;39(7):859-60.
13. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267(16):10931-4.
14. Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(1 Pt 1):126-31.

15. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64(2):327-36.
16. Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, O'Malley FP. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1260-5.
17. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
18. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339(6219):58-61.
19. Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22(10):1205-9.
20. Banner BF, Whitehouse R, Baker SP, Swanson RS. Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma: association with survival. *Am J Clin Pathol* 1998;109(6):733-7.
21. Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 1972;48(2):347-56.
22. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(12):883-93.
23. Weidner N FJ, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Institute* 1992;84:1875-87.
24. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143(2):401-9.
25. Gasparin G FJ. Basic and clinical research on angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A:2370-5.
26. Ellis LM WR, Gasparin G. Is determination of angiogenic activity in human tumours clinically useful? *Eur J Cancer* 1998;34:609-18.
27. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-84.
28. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38(12):1564-79.
29. Wild R, Ramakrishnan S, Sedgewick J, Griffioen AW. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. *Microvasc Res* 2000;59(3):368-76.
30. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88(7):1739-57.
31. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003;16(4):376-88.

32. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumours. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2501-5.
33. Fox SH, Whalen GF, Sanders MM, Burleson JA, Jennings K, Kurtzman S, et al. Angiogenesis in normal tissue adjacent to colon cancer. *J Surg Oncol* 1998;69(4):230-4.
34. Kuniyasu H, Yasui W, Shinohara H, Yano S, Ellis LM, Wilson MR, et al. Induction of angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *Am J Pathol* 2000;157(5):1523-35.
35. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996;77(8 Suppl):1722-8.
36. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994;37(9):921-6.
37. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995;222(6):695-9.
38. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(16):1110-7.
39. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996;78(2):226-31.
40. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997;132(5):541-6.
41. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57(6):1043-6.
42. Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998;55(6):575-81.
43. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC, et al. Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999;86(8):1421-30.
44. Galindo Gallego M, Fernandez Acenero MJ, Sanz Ortega J, Aljama A. Vascular enumeration as a prognosticator for colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 2000;36(1):55-60.
45. Galindo-Gallego M, Fernandez-Acenero MJ, Sanz-Ortega J, Aljama A, Lopez-Elzaurdia C. Prognostic significance of microvascular counts in rectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 2000;196(9):607-12.
46. Sternfeld T, Foss HD, Kruschewski M, Runkel N. The prognostic significance of tumor vascularization in patients with localized colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1999;14(6):272-6.

47. Sokmen S, Sarioglu S, Fuzun M, Terzi C, Kupelioglu A, Aslan B. Prognostic significance of angiogenesis in rectal cancer: a morphometric investigation. *Anticancer Res* 2001;21(6B):4341-8.
48. Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995;55(21):5049-53.
49. Pietra N, Sarli L, Caruana P, Cabras A, Costi R, Gobbi S, et al. Is tumour angiogenesis a prognostic factor in patients with colorectal cancer and no involved nodes? *Eur J Surg* 2000;166(7):552-6.
50. Pavlopoulos PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Kavantzias N, Nikolopoulou P, Davaris P. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;83(10):2067-75.
51. Tarta C, Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Chiele-Neto C, da Silva VD. Angiogenesis in advanced colorectal adenocarcinoma with special reference to tumoral invasion. *Arq Gastroenterol* 2002;39(1):32-8.
52. Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergstrom R, Glimelius B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996;14(2):461-6.
53. Abdalla SA, Behzad F, Bsharah S, Kumar S, Amini SK, O'Dwyer ST, et al. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol Rep* 1999;6(4):839-42.
54. Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Huget P, Goovaerts G, Weyler J, Lardon F, et al. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;79(2):316-22.
55. Konerding MA, Fait E, Gaumann A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer* 2001;84(10):1354-62.
56. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 1999;5(1):135-42.
57. Morson BC. Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg* 1968;55(10):725-31.
58. Watanabe T, Muto T. Colorectal carcinogenesis based on molecular biology of early colorectal cancer, with special reference to nonpolypoid (superficial) lesions. *World J Surg* 2000;24(9):1091-7.
59. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
60. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975;36(6):2251-70.
61. Muto T, Nagawa H, Watanabe T, Masaki T, Sawada T. Colorectal carcinogenesis: historical review. *Dis Colon Rectum* 1997;40(10 Suppl):S80-5.
62. Ikegami M. A pathological study on colorectal cancer. From de novo carcinoma to advanced carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 1987;37(1):21-37.
63. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y, et al. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum* 1985;28(11):847-51.

64. Wolber RA, Owen DA. Flat adenomas of the colon. *Hum Pathol* 1991;22(1):70-4.
65. Adachi M, Muto T, Morioka Y, Ikenaga T, Hara M. Flat adenoma and flat mucosal carcinoma (IIb type)--a new precursor of colorectal carcinoma? Report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1988;31(3):236-43.
66. Kuramoto S, Oohara T. Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 1989;64(4):950-5.
67. Kudo S. Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy* 1993;25(7):455-61.
68. Tada S, Yao T, Iida M, Koga H, Hizawa K, Fujishima M. A clinicopathologic study of small flat colorectal carcinoma. *Cancer* 1994;74(9):2430-5.
69. Hamilton SR VB, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR AL, editor. *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press; 2000. p. 104-119.
70. Rembacken BJ, Fujii T, Cairns A, Dixon MF, Yoshida S, Chalmers DM, et al. Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK. *Lancet* 2000;355(9211):1211-4.
71. Kudo S. Endoscopic Diagnosis. In: Kudo S, editor. *Early Colorectal Cancer - Detection of depressed types of colorectal carcinoma*. Tokyo: Igaku-Shoin; 1996. p. 19-47.
72. Watanabe T, Sawada T, Kubota Y, Adachi M, Saito Y, Masaki T, et al. Malignant potential in flat elevations. *Dis Colon Rectum* 1993;36(6):548-53.
73. Fujimori T, Satonaka K, Yamamura-Idei Y, Nagasako K, Maeda S. Non-involvement of ras mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1994;57(1):51-5.
74. Ozawa A, Konishi F, Fukayama M, Kanazawa K. Apoptosis and its regulation in flat-type early colorectal carcinoma: comparison with that in polypoid-type early colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2000;43(10 Suppl):S23-8.
75. Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, et al. Flat-elevated colorectal neoplasms exhibit a high malignant potential. *Oncology* 1996;53(2):89-93.
76. Jass JR. Histopathology of early colorectal cancer. *World J Surg* 2000;24(9):1016-21.
77. Kudo S. Superficial depressed type of colorectal cancer. *Gastroenterol Endosc* 1986;28:2811-13.
78. Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989;64(5):1138-46.
79. Kuramoto S, Oohara T. Minute cancers arising de novo in the human large intestine. *Cancer* 1988;61(4):829-34.
80. Sato T, Konishi F, Togashi K, Ozawa A, Kanazawa K. Prospective observation of small "flat" tumors in the colon through colonoscopy. *Dis Colon Rectum* 1999;42(11):1457-63.
81. Watari J, Saitoh Y, Obara T, Fujiya M, Maemoto A, Ayabe T, et al. Natural history of colorectal nonpolypoid adenomas: a prospective colonoscopic study and

- relation with cell kinetics and K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 2002;97(8):2109-15.
82. Rubio CA. Differences in angiogenesis and collagenesis between exophytic and flat adenomas of the colorectal mucosa. *Anticancer Res* 1997;17(1B):737-42.
83. Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K. Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001;44(8):1129-36.
84. Silva VD. Caracterização de lesões e núcleos celulares neoplásicos por método de assinatura digital [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
85. Weibel E. Stereological principles for morphometry in electron microscopy. *Int Rev Cytol* 1979;26:235-302.
86. Gil J, Barba J. Principles of stereology. Computerized applications to anatomic pathology. In: Marchevsky AM, Bartels PH, editor. *Image Analysis: A Primer for Pathologists*. New York: Raven Press, Ltd; 1994. p. 79-124.
87. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988;96(5):379-94.
88. Gundersen HJ, Jensen EB. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J Microsc* 1985;138 (Pt 2):127-42.
89. Rahman SM, Itakura H. Morphometry in histopathology. An image analysis workstation for the pathology laboratory. *Anal Quant Cytol Histol* 1996;18(6):471-80.
90. Hamilton PW, Allen DC. Morphometry in histopathology. *J Pathol* 1995;175(4):369-79.
91. Wang W, Campiche M. Microvasculature of human colorectal epithelial tumors. An electron microscopic study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1982;397(2):131-47.
92. Skinner SA, Frydman GM, O'Brien PE. Microvascular structure of benign and malignant tumors of the colon in humans. *Dig Dis Sci* 1995;40(2):373-84.
93. Jass JR. Tumors of the small and large intestines (including the anal region). In: Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. second ed: Churchill Livingstone; 2000. p. 369-409.
94. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983;14(11):931-68.
95. Mukai K, Rosai J. Applications of immunoperoxidase techniques in surgical pathology. In: Wolff M, Fenoglio CM, editor. *Progress in surgical pathology*. New York: Masson Publishing USA I; 1980. p. 15-99.
96. Rasband W. Scion Image Beta2 version on line. <http://www.scioncorp.com>. National Institutes of Health, modified by Scion Corporation; Frederick. In; 1997.
97. Belien JA, Somi S, de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 1999;52(3):184-92.
98. Axelsson K LB, Moore DH, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Institute* 1995;87:997-1008.

99. Fridman V, Humblet C, Bonjean K, Boniver J. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. *Virchows Arch* 2000;437(6):611-7.
100. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21(3):505-15.
101. Carmeliet P. Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature* 1999;401(6754):657-8.
102. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407(6801):249-57.
103. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-64.
104. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23(7):755-61.
105. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(8):614-9.
106. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994;54(3):800-4.
107. Cromwell JW G-AJ. The molecular basis of cancer metastasis. *Seminars in Colon & Rectal Surgery* 1998;9:53-62.
108. Saeki T, Tanada M, Takashima S, Saeki H, Takiyama W, Nishimoto N, et al. Correlation between expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (thymidine phosphorylase) and microvessel density in early-stage human colon carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 1997;27(4):227-30.
109. Kondo Y, Arii S, Furutani M, Isigami S, Mori A, Onodera H, et al. Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88(8):1820-7.
110. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R. In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res* 1994;210(2):298-305.
111. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270(17):9709-16.
112. Morita T, Tomita N, Ohue M, Sekimoto M, Yamamoto H, Ohnishi T, et al. Molecular analysis of diminutive, flat, depressed colorectal lesions: are they precursors of polypoid adenoma or early stage carcinoma? *Gastrointest Endosc* 2002;56(5):663-71.
113. Matsui T, Yao T, Yao K, Takenaka K, Sakurai T, Iwashita A, et al. Natural history of superficial depressed colorectal cancer: retrospective radiographic and histologic analysis. *Radiology* 1996;201(1):226-32.
114. Umetani N, Masaki T, Watanabe T, Sasaki S, Matsuda K, Muto T. Retrospective radiographic analysis of nonpedunculated colorectal carcinomas with special reference to tumor doubling time and morphological change. *Am J Gastroenterol* 2000;95(7):1794-9.
115. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.

116. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):3-9.
117. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60(5):1388-93.
118. Kim NT, Elie N, Plancoulaine B, Herlin P, Coster M. An original approach for quantification of blood vessels on the whole tumour section. *Anal Cell Pathol* 2003;25(2):63-75.
119. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen PB, Bonoldi E, Dirix LY, et al. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(11):2625-34.
120. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995;177(3):275-83.
121. Vermeulen PB, Libura M, Libura J, O'Neill PJ, van Dam P, Van Marck E, et al. Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42(2):165-72.
122. Hannen EJ, van der Laak JA, Kerstens HM, Cuijpers VM, Hanselaar AG, Manni JJ, et al. Quantification of tumour vascularity in squamous cell carcinoma of the tongue using CARD amplification, a systematic sampling technique, and true colour image analysis. *Anal Cell Pathol* 2001;22(4):183-92.
123. Fox SB, Leek RD, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Harris AL. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas--relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29(1):109-16.
124. Chalkley HW. Method for the Quantitative Morphologic Analysis of Tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943;4:47-53.
125. Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer* 2003;39(7):881-90.
126. Fox SB, Gatter KC, Leek RD, Harris AL, Chew KL, Mayall BH, et al. More about: Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(2):161-2.
127. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):139-46.
128. Fox SB, Taylor M, Grondahl-Hansen J, Kakolyris S, Gatter KC, Harris AL. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. *J Pathol* 2001;195(2):236-43.
129. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(20):4625-9.
130. Offersen BV, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Patterns of angiogenesis in nonsmall-cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;91(8):1500-9.

131. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, Fox S, Whitehouse R, Talbot DC, et al. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1996;179(1):80-8.
132. Cox G, Walker RA, Andi A, Steward WP, O'Byrne KJ. Prognostic significance of platelet and microvessel counts in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000;29(3):169-77.
133. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999;188(4):369-77.
134. Chaudhary R, Bromley M, Clarke NW, Betts CD, Barnard RJ, Ryder WD, et al. Prognostic relevance of micro-vessel density in cancer of the urinary bladder. *Anticancer Res* 1999;19(4C):3479-84.
135. Offersen BV, Borre M, Sorensen FB, Overgaard J. Comparison of methods of microvascular staining and quantification in prostate carcinoma: relevance to prognosis. *Apmis* 2002;110(2):177-85.
136. Borre M, Offersen BV, Nerstrom B, Overgaard J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer* 1998;78(7):940-4.
137. Offersen BV, Knap MM, Marcussen N, Horsman MR, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Intense inflammation in bladder carcinoma is associated with angiogenesis and indicates good prognosis. *Br J Cancer* 2002;87(12):1422-30.
138. Simpson JF, Ahn C, Battifora H, Esteban JM. Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. *Cancer* 1996;77(10):2077-85.
139. Wester K, Ranefall P, Bengtsson E, Busch C, Malmstrom PU. Automatic quantification of microvessel density in urinary bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81(8):1363-70.
140. Boyle JJ, Wilson B, Bicknell R, Harrower S, Weissberg PL, Fan TP. Expression of angiogenic factor thymidine phosphorylase and angiogenesis in human atherosclerosis. *J Pathol* 2000;192(2):234-42.
141. van Der Laak JA, Pahlplatz MM, Hanselaar AG, de Wilde PC. Hue-saturation-density (HSD) model for stain recognition in digital images from transmitted light microscopy. *Cytometry* 2000;39(4):275-84.
142. Brey EM, King TW, Johnston C, McIntire LV, Reece GP, Patrick CW, Jr. A technique for quantitative three-dimensional analysis of microvascular structure. *Microvasc Res* 2002;63(3):279-94.
143. Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. *Eur J Cancer* 2003;39(13):1835-41.
144. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155(3):739-52.
145. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999;59(4):856-61.

9 ANEXO

Artigo científico enviado para publicação no periódico *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*

**DIGITAL IMAGE ANALYSIS AND STEREOLOGY OF ANGIOGENESIS IN POLYPOID
AND NON-POLYPOID COLORECTAL ADENOMAS**

Cláudio Tarta, M.D.¹

Vinícius Duval da Silva, M.D. Ph.D.¹

Cláudio Rolim Teixeira, M.D. Ph.D.²

João Carlos Prolla, M.D. Ph.D.¹

Luise Meurer, M.D. Ph.D.¹

Cesar Chiele Neto, M.D.³

Shinji Tanaka, M.D.⁴

¹ Departments of Surgery and Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Fundação Universitária de Gastroenterologia – FUGAST (Porto Alegre, Brazil)

³ Department of Clinical Surgery, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

⁴First Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan.

Author responsible for correspondence: Cláudio Tarta
Adress: Rua Mostardeiro, 157 sala 403. Porto Alegre, RS, Brazil.
CEP:90430 001. E-mail: tarta.ez@terra.com.br
Telephone: 55-51- 33466133, telefax: 55-51- 33466133

ABSTRACT

Angiogenesis is essential in the tumoral development. In colorectal neoplasias the parameters of the digital image analysis and stereology of angiogenesis have been little studied. Objective: evaluate three-dimensional parameters and the bidimensional microvascular quantification in the different morphologic presentations of the adenomas. Material and methods: transversal historical study was carried out, including 102 colorectal neoplastic lesions, obtained by endoscopic or surgical resection. For the analysis of angiogenesis, immunohistochemistry, digital image analysis, microvascular quantification and stereology were used. Results: the microvascular quantification, volume and microvascular length estimate has gradually raised in the polypoid lesions with high-grade dysplasia comparing to the ones of low-grade ($P < 0.001$). There was no significantly difference in angiogenesis between the polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas through the quantification and microvascular length estimate. Conclusion: the use of the digital image analysis and stereology added greater objectivity and effectiveness in the methodology of angiogenic evaluation, because it allowed the accurate segmentation of hypervascular areas, the representation of characteristic three-dimensional morphology of vascular suppliment and identification of differences in the microvascularization in the evolutive stages of the colorectal cancer. However, no significant relation could be found between macroscopic type and angiogenesis in the present study, suggesting that angiogenesis may contribute little to morphogenesis of colorectal adenomas.

KEYWORDS: angiogenesis, microvessels, stereology, digital image analysis.

INTRODUCTION

The angiogenesis associated to solid tumors is a process in which new capillaries are formed in the tumoral stroma from endothelial cells of the host. This promotes the tumoral growth through oxygen and nutrients perfusion and withdrawal of toxic metabolites, instead of the simple diffusion in the extra cellular space that maintains the tumor restrict and with a small cell population.¹⁻³ The availability of a colorectal carcinogenesis model, based on cumulative genetic mutations in the polyp-cancer sequence and, more recently, in the carcinogenic potential of non-polypoid lesions⁴⁻⁷, represents an important study field on angiogenesis in the early tumoral development where it represents a fundamental step.

Most of the studies described in literature, evaluate the angiogenesis as one among several candidates to potential prognostic factors of the colorectal carcinoma including retrospective series in advanced and with limited number of patients, whose interpretation of results is frequently harmed by the variations in the used adjuvant therapy, selection of patients and in the methodology, such as different endothelial markers, optical magnification, selection of representative areas and analysis of different quantitative parameters in the microvascular evaluation.⁸⁻¹⁰

Considering the three-dimensional complexity of the microvascular tumoral net, the lack of straight correlation between the image obtained in two planes and the three-dimensional morphology represents an important methodological limitation in the adequacy of the obtained section.¹¹ The application of stereology contributes to a more accurate representation of the

angiogenic potential of tumors, because it represents a group of methods for quantitative measure of three-dimensional microscopic structures in histological sections, based on the existent correlation between the structure, originally three-dimensional, and its characteristics in the section in two planes.^{12,13}

To our knowledge this is the first study to analyze, besides the quantification, morphometric characteristics of microvessels in polypoid and non-polypoid colorectal adenomas through digital image analysis and stereology, aiming at studying the association of the angiogenesis with the morphologic growth pattern in the initial steps of the colorectal carcinogenesis, besides the comparison among the different methods of angiogenesis evaluation.

MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIAL

Archival material of 102 neoplastic colorectal lesions, obtained by endoscopic or surgically excised between 1997 and 2001, from patients of the Department of Pathology of Federal University of Rio Grande do Sul, Hospital de Clinicas de Porto Alegre and of the Fundacao Universitaria de Gastroenterologia (Porto Alegre, Brazil) were included in this study. Blocks of wax containing specimen were selected, previously fixed in formalin 10% and submitted to the 4 μ m section, and stained with hematoxylin and eosin. The sample was divided into 36 polyps with

low-grade dysplasia (PLDG), 27 polyps with high-grade dysplasia (PHDG), 27 non-polypoid lesions with low-grade dysplasia (NPLDG) and 12 non-polypoid lesions with high-grade dysplasia (NPHDG). All histologic sections were submitted to microscopic review by the pathologist and researcher, without any previous knowledge of the morphologic and histopathological characteristics of the lesion, aiming at standardizing the diagnosis criteria.

The macroscopic classification of the colorectal lesions followed the criteria from World Health Organization Classification of Tumours.¹⁴ According to the morphologic growth pattern, they were classified as polypoid and non-polypoid. Microscopically, lesions with thickness that was inferior to double the size of the adjacent mucosa, were classified as non-polypoid.^{15,16} Concerning the grade of dysplasia the adenomas were classified as presenting low-grade dysplasia (grouping low and moderate dysplasia) and high-grade dysplasia.¹⁷

2.2 Immunohistochemistry

The microvascularization was identified through immunohistochemistry, according to previously described technique,¹⁸ with the use of primary endothelial anti-body anti CD31 (Monoclonal Mouse Anti-Human Endothelial Cell, CD31 Clone JC/70A Code nr. MO823 Lot 070 Edition 16.07.99 DAKO A/S – Denmark) in non-waxed histopathologic sections. The streptoavidine-biotine complex – DAKO StrepAB (Large Volume DAKO LSAB and Kit, Peroxidase Universal K0690 DAKO Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA) was used in order to visualize the immunoreaction, using the tetrahydrochloret as chromogen (DAKO DAB Chromogen tablets, DAKO A/S,

Denmark) and counter-coloring with hematoxylin of Harris. Histologically, the microvessels were recognized by the brownish color, contrasting with the counter-coloring with blue basis (hematoxylin of Harris), representing the positive controls to the immunohistochemical reaction with anti-CD31.

2.3 Digital image analysis in the evaluation of microvascularization

The system used was digital image analysis composed of optical microscope Olympus BX60 (Tokyo, Japan) with planochromatic neofluar objectives (SWH10X-H/26.5) connected through a video camera (SONY model DXC-970MD 3 CCD – color video camera) to the computer with Image Pro Capture kit (media Cybernetics, Silver Spring, USA) and software Image Pro Plus version 4.5. Installed, they permit digital capture and storing of images containing areas of interest.

The hypervascular areas – the hot spots – were selected in 100 magnification (UPLANFI 10x/0,30Ph1 ∞ /-) from the higher concentration of microvessels stained by anti-CD31. Afterwards, each hypervascular area was analysed in 200 magnification (UPLANFI 20x/0.50Ph1 ∞ /0,17). Where any cell or cell group showing positive staining (brownish), with or without lumen and/or erythrocyte, clearly isolated from adjacent muscular wall vessels, tumoral cells and other conjunctive tissue elements, was considered a countable microvessel. Areas presenting fibrosis, hemorrhage, necrosis, and inflammation were excluded from the counting.^{19,20} With image software Scion Image for Windows, 2000 (NIH, USA) and Image Pro Plus 4.5 the quantification, volume and microvascular length estimate were performed through bidimensional stereologic counting with grid correction (field

amplitude of 600 x 440 pixels, corresponding to an area of 0,66mm², 200x) being considered countable only the microvessels completely included inside the correction grid, or hitting the border line of it.^{12,13}

The microvascular counting was objectively ranked in an ordinal scale, expressed by the number of microvessels in the hypervascular area (figure 1). The volume estimate was performed through the criteria proposed by Cavalieri.^{12,13} To the captured image containing the area of interest the grid is overlapped a grid with points distributed at random with fixed gaps among them (field amplitude of 600 x 440 pixels with 17 x 9 points). The points hitting the microvessels are named profiles, being added in each histologic section. For each structure count all P points that hit it. In this way the absolute area of the structure section is $a(\text{sect}) = a(p) \cdot P(\text{struct})u^2$, where $a(p)$ is the area in square (u^2), associated to each point in the regular system test. The volume is estimate after the sum of all points that hit the structure.

$$V(\text{struct}) = t \cdot a(p) \cdot \sum P(\text{struct}) u^3$$

The probability that a given structure is hit by a randomly positioned and randomly oriented section is proportional to its linear dimension or length. From the knowledge of the number of profiles in a determined hypervascular area and of the volume we applied the following formula to the estimate the microvascular length: $L(\text{struct}) = 2 \cdot Q_A(\text{struct} / \text{ref}) \cdot V(\text{ref}) u$ where the numerical density in the plane Q_A is estimated as described above for number of profiles in general.

2.4 Statistical analysis

The data referring to quantitative variation, number of total microvessels and number of microvessels/hotspots were described by median and interquartile range (P25 to P75) due to strong asymmetry observed in the distribution of frequencies. For the statistical comparison of groups, we used rank and logarithmic math transformations, being subsequently applied the variance analysis technique (ANOVA) oneway. The location of differences by tests of multiple comparisons (post hoc procedure) was performed by the Duncan test. As the findings obtained were very alike, we chose to present the results of the logarithm transformation, what enables the approximation of asymmetric data to a normal distribution, permitting the use of a parametric test like ANOVA oneway. The data submitted to logarithmic transformation, were also analyzed by the linear regression technique, what enabled the evaluation of linear tendencies of the angiogenesis phenomena among the groups studied. The significance level adopted was $\alpha = 0,05$. The data were analyzed with the help of Statistical Package for the Social Sciences – SPSS version 11.0.

The study was performed after approval of the Ethics and Scientific Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

RESULTS

3.1 Microvascular counting (nr microvessels)

The evaluation of microvascular counting in the histological sections shows that when comparing the medians of the number of microvessels among the different colorectal lesions, a statistically significant difference was observed among the

groups of ANOVA oneway ($P < 0,001$). To the multiple comparisons test of Duncan were identified three layers with low, medium and high number of microvessels. However, the absolute differentiation among groups was not clear. While analyzing this data, using a regression model, it was possible to identify a clear linear tendency, indicating that as the grade of dysplasia progresses, the polypoid growth increases, in a statistically significant way, the number of microvessels of the lesion ($P < 0,001$) (table 1).

3.2 Stereology (volume and microvascular length estimate)

The microvascular stereological evaluation shows that not only the volume but also the length repeated the pattern observed for the number of microvessels (absolute counting of microvessels). However, when we compare the stereological patterns among lesions of high-grade dysplasia, these have shown to be significantly higher in polypoid lesions when comparing to non-polypoid ones ($P < 0,001$). This way, it was possible to observe a statistically significant tendency for the enhancement in these indicators as the dysplasia and polypoid morphology progress (table 1).

DISCUSSION

Although the role of environmental and/or genetic factors in the angiogenic activation and in the consequent tumoral growth is not completely elucidated, experimental evidences show that the angiogenesis can occur as early as the transition from hyperplasia to neoplasia.^{21,22} The results found in the present study

show that the angiogenesis is early stimulated during the tumorigenesis and that the formation of new microvessels occurred before the beginning of the malignity in polypoid lesions, resulting in a statistically significant growth in the microvascular volume and length in the lesions with high-grade dysplasia compared to the low-grade ones. Similar findings were previously described by Aotake et al.²³, although Bossi et al.²⁴ hadn't found any difference in the quantification between polypoid with high-grade dysplasia compared to the low-grade ones evaluating microvessel density alone.

When comparing the different morphologic presentations of the colorectal adenoma, we did not find any statistically significant difference in the microvascular quantification among polypoid and non-polypoid lesions, indifferently to the dysplasia grade, although the analysis of stereological parameters could detect significantly higher values in the polypoid lesions with high-grade dysplasia compared to non-polypoid. The differences found that reached statistical significance, can be the result, in a way, of the detection capacity of the three-dimensional microvascular heterogeneity through stereological analysis. The mechanisms responsible for two different ways of neoplastic development and the resulting heterogeneity of morphologic presentations are not completely elucidated. However, according to the results obtained in this study, the angiogenesis does not seem to be the determinant factor. Similar findings have been described recently by Oh-e et al.²⁵, although Rubio²⁶ has shown that the microvascularization is found significantly higher in polypoid adenomas in relation to the non-polypoid ones, suggesting that these ones need a bigger vascular support in order to sustain its exophytic growth.

The studies of the angiogenesis in different human solid tumors, most of the time, analyse it only through the microvascular quantification in two planes histologic sections, not considering the morphometric parameters that could be shown as significant, taking into account the three-dimensional complexity of the tumoral microvascularization. Besides the biological tumoral heterogeneity and, in particular, similar to other tumoral markers, to vascular intra-tumoral heterogeneity^{27,28}, it is possible that part of the diversity of results found in the studies of the angiogenesis be explained by the significant methodological limitations in the evaluation of the microvascular counting, which is influenced by coiling, tortuosity and compression of vessels.²⁹ The application of stereology contributes to a more accurate representation of the angiogenic potential of tumors, because it allows the acquisition of quantitative information about three-dimensional structures in the histologic sections based on the correlation that exists between the structure, originally three-dimensional, and its characteristics in the two-plane sections obtained through the section of histologic blocks.^{12,13} In the attempt to decrease the potential of human intervention in the analysis of the interest areas, the addition of the digital image analysis represents a significant advance in relation to the conventional analogical analysis, for it allows, besides the accurate segmentation of the area to be analyzed without overlapping the fields, storage of images for analysis and subsequent comparison and the insertion of graphic resources that allow the stereological analysis.

In this study, the intra-tumoral vascular heterogeneity was corrected through the stereology that reflects the vascular geometry of the hypervascular areas

selected in each histologic section, showing superiority in relation to the microvascular quantification in two planes as statistically significant differences were found in the estimates of volume and microvascular length among the polypoid lesions presenting high- and low-grade dysplasia and among polypoid and non-polypoid lesions presenting a high-grade dysplasia. With application of the stereologic correction grid were considered countable microvessels only the ones included in the self determined area avoiding, this way, the inclusion of structures whose limits would be beyond the analyzed field, or that would be repeatedly included in close by fields what would result in a wrongly higher quantification.^{12,13}

The resulting estimates from the stereological analysis are completely independent from the sections orientation and the shape of the object (ie. by the different section planes of the hypervascular areas) and the proportions are kept no matter what magnification was used, not having another condition demanded for the application of this method, except that the position of the first section in the object should be random.¹³ Some authors have suggested that besides the microvascular quantification, the vascular area should be considered as an important parameter in the angiogenic evaluation.^{10,30,31}

Because of controversial results found in certain studies of the angiogenesis as a prognostic factor and that use the methodology initially proposed by Weidner et al. in 1991¹⁹ – whose main point is the microvascular quantification in the areas that are more intensively vascularized – recently, questions have been raised about the application of this methodology because of its low reproducibility, a result, mainly, of the human intervention in the selection of the hypervascular areas and the

identification of microvessels. Advances have been obtained in the attempt of the objective quantification of the angiogenesis through the introduction of semi-automatic and automatic procedures. However, they need advanced technology and still are dependant of increment in the immunohistochemical technique and of the resolution of the image system.³²

The importance of the development of low cost methodology, reproducible and of easy clinic application is the great challenge in the angiogenesis research. The possibility of comparison among the different studies of the angiogenesis associated to neoplasia, based on consolidated methodology, objective and presenting the lowest possible level of human intervention, will allow it to be defined as an important prognostic factor in the different human neoplasia and the selection of candidates to anti-angiogenic therapeutics from a reliable measurement of the angiogenic rate. The results presented in this study suggest that the digital image analysis and stereology represent important advances in the angiogenesis evaluation, through the accurate segmentation of the analyzed fields and the evaluation of the three-dimensional structure characteristic of the neoplastic vascular supply, what may represent, this way, more effectiveness in the methodology of angiogenic evaluation when utilized in association to the evaluation of microvessel density already widely used. However, prospective studies in a larger patient population comparing these counting methods are warranted, in order to test the proposed cut-off points from already published studies, and the prognostic value of angiogenesis associated to neoplasia.

REFERENCES

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
2. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82(1):4-6.
3. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333(26):1757-63.
4. Muto T, Nagawa H, Watanabe T, Masaki T, Sawada T. Colorectal carcinogenesis: historical review. *Dis Colon Rectum* 1997;40(10 Suppl):S80-5.
5. Ikegami M. A pathological study on colorectal cancer. From de novo carcinoma to advanced carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 1987;37(1):21-37.
6. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y, et al. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum* 1985;28(11):847-51.
7. Wolber RA, Owen DA. Flat adenomas of the colon. *Hum Pathol* 1991;22(1):70-4.
8. Wild R, Ramakrishnan S, Sedgewick J, Griffioen AW. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. *Microvasc Res* 2000;59(3):368-76.
9. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003;16(4):376-88.

10. Pavlopoulos PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Kavantzias N, Nikolopoulou P, Davaris P. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;83(10):2067-75.
11. Gil J, Barba J. Principles of stereology. Computerized applications to anatomic pathology. In: Marchevsky AM, Bartels PH, editor. *Image Analysis: A Primer for Pathologists*. New York: Raven Press, Ltd; 1994. p. 79-124.
12. Gundersen HJ, Jensen EB. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J Microsc* 1985;138 (Pt 2):127-42.
13. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988;96(5):379-94.
14. Hamilton SR VB, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR AL, editor. *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press; 2000. p. 104-119.
15. Kudo S. Endoscopic Diagnosis. In: Kudo S, editor. *Early Colorectal Cancer - Detection of depressed types of colorectal carcinoma*. Tokyo: Igaku-Shoin; 1996. p. 19-47.
16. Watanabe T, Sawada T, Kubota Y, Adachi M, Saito Y, Masaki T, et al. Malignant potential in flat elevations. *Dis Colon Rectum* 1993;36(6):548-53.
17. Jass JR. Tumors of the small and large intestines (including the anal region). In: Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. second ed: Churchill Livingstone; 2000. p. 369-409.

18. Mukai K RJ. Applications of immunoperoxidase techniques in surgical pathology. In: Wolff M, Fenoglio CM, editor. Progress in surgical pathology. New York: Masson Publishing USA I; 1980. p. 15-99.
19. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
20. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-84.
21. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339(6219):58-61.
22. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-64.
23. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 1999;5(1):135-42.
24. Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995;55(21):5049-53.
25. Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K. Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001;44(8):1129-36.
26. Rubio CA. Differences in angiogenesis and collagenesis between exophytic and flat adenomas of the colorectal mucosa. *Anticancer Res* 1997;17(1B):737-42.
27. Axelsson K LB, Moore DH, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Institute* 1995;87:997-1008.

28. Fridman V, Humblet C, Bonjean K, Boniver J. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. *Virchows Arch* 2000;437(6):611-7.
29. Sokmen S, Sarioglu S, Fuzun M, Terzi C, Kupelioglu A, Aslan B. Prognostic significance of angiogenesis in rectal cancer: a morphometric investigation. *Anticancer Res* 2001;21(6B):4341-8.
30. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995;177(3):275-83.
31. Simpson JF, Ahn C, Battifora H, Esteban JM. Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. *Cancer* 1996;77(10):2077-85.
32. Kim NT, Elie N, Plancoulaine B, Herlin P, Coster M. An original approach for quantification of blood vessels on the whole tumour section. *Anal Cell Pathol* 2003;25(2):63-75.

FIGURE LEGEND

Figure 1 – Digital image analysis and bidimensional quantification by stereologic method using Image pro-plus 4.5. The brownish colored microvessels (immunohistochemistry, anti-CD31) considered valid were the ones located inside the area of the correction grid, being the number of microvessels of each studied field divided by the grid area (600 x 440 pixels, 0,66mm², 200X).

Figure 1 corresponde à Figura 13 (página 45)

TABLE

Table 1. Comparison of microvessel quantification and stereology measurements between non-polypoid and polypoid colorectal adenomas

	NPLDG	NPHDG	PLDG	PHDG	
n	n=27	n=12	n=36	n=27	p
Microvessels	22,0 ^a (16,0 - 40,0)	29,5 ^{a,b} (22,1 - 50,6)	41,8 ^{a,b} (15,8 - 71,9)	60,0 ^{b,c} (23,0 - 95,6)	<0,001
Microvascular volume	152 ^a (92 - 248)	306 ^{a,b} (118 - 997)	178 ^b (93 - 601)	728 ^c (416 - 1408)	<0,001
Microvascular length ‡	17,5 ^a (4,4 - 54,7)	47,4 ^b (10,6 - 243,6)	24,0 ^{a,b} (6,5 - 142,2)	242,4 ^c (131,1 - 936,8)	<0,001

The data referring were described by median and interquartile range

Non-coincident index letters represent statistically significant differences to the tests of post hoc and Duncan, applied after the analysis of a criteria variation. (ANOVA oneway).

NPLDG: non-polypoid low-grade dysplasia growth; NPHDG: non-polypoid high-grade dysplasia growth; PLDG: polypoid low-grade dysplasia growth; PHDG: polypoid high-grade dysplasia growth.

‡ microvascular length x 1000.

