

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FATOR DE
CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) E
DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO
EPITELIAL (EGFR) COMO FATORES
PROGNÓSTICOS MOLECULARES PARA
METÁSTASES HEPÁTICAS DE CÂNCER
COLORRETAL**

ADSON ROBERTO SANTOS NEVES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Herman

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Soares

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Neves, Adson Roberto Santos

Análise da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) como fatores prognósticos moleculares para metástases hepáticas de câncer colorretal /

Adson Roberto Santos Neves – São Paulo, 2009.

74p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Paulo Herman

Descritores: 1. RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTELIO VASCULAR. 2. FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR. 3. PROGNÓSTICO. 4. METÁSTASES. 5. HEPÁTICAS. 6. CÂNCER COLORRETAL.

DEDICATÓRIA

A minha esposa Adriana, presente de Deus. Razão da minha vida. Pessoa que respeito, ouço, admiro e amo de todo meu coração e toda a minha alma.

Aos meus pais Edson e Mara, por tudo que sou... Pela vida que me proporcionaram; pelo amor incondicional e pelo sacrifício por uma educação privilegiada.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Herman, meu orientador, exemplo a ser seguido como médico e pesquisador, por sua impressionante capacidade de trabalho e clareza de raciocínio. Pelo apoio e conselhos sempre sábios, não apenas para a realização deste trabalho e de meu progresso profissional, mas também para a minha vida pessoal.

Ao Professor Doutor Fernando Augusto Soares, por seu exemplo de liderança e de chefia, dedicação médica e busca incessante por novos conhecimentos.

À Doutora Renata Coudry, por sua constante e incansável busca pela pesquisa e desenvolvimento científico e apoio incondicional a este trabalho.

Ao amigo e colega de residência médica Wilson Costa, pelo auxílio e atenção disponibilizados na elaboração deste trabalho.

Ao Doutor José Humberto Fregnani, pelo auxílio na análise estatística e pela amizade.

RESUMO

Neves ARS. **Análise da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) como fatores prognósticos moleculares para metástases hepáticas de câncer colorretal.** São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A ressecção hepática é o mais efetivo tratamento para os pacientes portadores de metástases hepáticas de câncer colorretal (CCR). Em 5 anos, a sobrevida estimada é de 25 a 57 % após a ressecção hepática. Atualmente, para avaliar o prognóstico da metástase hepática, alguns marcadores biológicos têm sido investigados e novos fatores de risco identificados, influenciando a sobrevida dos pacientes submetidos à cirurgia hepática. Este estudo avaliou retrospectivamente 83 pacientes submetidos à ressecção hepática por metástase colorretal. Nós avaliamos a expressão do VEGF e do EGFR no tecido tumoral, pelo método de “tissue array” e a intensidade da expressão, através do modo automatizado, utilizando o programa ACIS. A análise dos resultados associou a expressão dos VEGF e do EGFR no tecido tumoral com a sobrevida dos pacientes operados. Neste estudo, a expressão do VEGF na metástase hepática de câncer colorretal foi identificada como fator prognóstico independente. A expressão do EGFR não apresentou impacto na sobrevida, bem como não esteve relacionado a nenhuma das variáveis histopatológicas.

SUMMARY

Neves ARS. **[Analysys of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) as molecular prognostic factors in patients with liver metastases from colorectal cancer]**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Hepatic resection is the most effective treatment option available for patients with liver metastases from colorectal carcinoma (CRC). Several large series have reported a 25 to 57 percent long-term survival rate after curative resection of liver metastases. To evaluate the prognosis of liver metastasis, several biological markers have been investigated and new risk factors have been reported to influence survival after liver metastasis resection. This study assessed retrospectively 83 patients operated with curative intent, with the diagnosis of liver metastasis of colorectal cancer. We assessed the impact on survival of the expression of VEGF and EGFR in the tumoral tissue through the method of tissue array and through an automated manner, with the ACIS program. In this study, vascular endothelial growth factor expression in liver metastatic from colorectal carcinoma showed to be an important prognostic marker. Wherever, EGFR did not show an impact on survival, and was not related to any of the histopathological variables.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da punção e transferência das áreas selecionadas do bloco doador para o bloco receptor – “tissue microarray”.....	21
Figura 2	Aspecto das lâminas receptoras (cada “core” corresponde a um caso ou tecido a ser estudado).....	22
Figura 3	Aspecto da imagem do programa utilizado, em detalhe a marcação das áreas de interesse(focos de neoplasia).....	25
Figura 4	Sobrevida global.....	31
Figura 5	Sobrevida livre de doença.....	32
Figura 6	Gráfico da sobrevida global em função do valor sérico do antígeno carcinoembrionário (CEA) pré-hepatectomia.....	33
Figura 7	Gráfico mostrando o impacto da dimensão das metástases com a sobrevida.....	34
Figura 8	Gráfico da sobrevida global em função da presença de doença bilobar.....	35
Figura 9	Gráfico mostrando o impacto do número de nódulos na sobrevida global.....	36
Figura 10	Gráfico mostrando o impacto do número de lesões metastáticas na sobrevida livre de doença.....	37
Figura 11	Expressão do VEGF x Sobrevida Global.....	39

Figura 12	Expressão do EGFR(ACIS) x Sobrevida Global.....	43
Figura 13	Expressão do EGFR (não automatizado) x Sobrevida Global.....	44
Figura 14	Correlação entre a expressão do EGFR avaliada pelo ACIS e por imunohistoquímica.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sobrevida em pacientes submetidos a ressecção hepática por câncer colorretal.....	3
Tabela 2	Escore prognóstico.....	5
Tabela 3	Crítérios de risco para pacientes com metástase hepática de câncer colorretal.....	6
Tabela 4	Número de nódulos hepáticos X Sobrevida.....	6
Tabela 5	Classificação da expressão protéica de EGFR na membrana.....	26
Tabela 6	Características clínicas e patológicas dos pacientes estudados relacionado ao tumor primário.....	30
Tabela 7	Probabilidades de sobrevida global em 5 anos de acordo com a expressão do VEGF.....	38
Tabela 8	Avaliação dos valores medianos de expressão de VEGF obtidos pelo ACIS de acordo com diversas variáveis.....	41
Tabela 9	Probabilidades de sobrevida global em 5 anos de acordo com a expressão do EGFR.....	43
Tabela 10	Avaliação dos valores medianos de expressão de EGFR obtidos pelo ACIS de acordo com diversas variáveis.....	46
Tabela 11	Avaliação dos valores medianos de expressão de EGFR obtidos pela imunoistoquímica de acordo com diversas variáveis.....	47
Tabela 12	Resultado da análise multivariada. Fatores de risco para óbito de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Proteína quinase ativada pela PI3K
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epitelial
HIF	Hypoxia-inducible factors
IC	Intervalo de confiança
MAP	Proteína mitógeno-ativada
MMP	Metaloproteinases da matriz
MHCCR	Metástases hepáticas de câncer colorretal
N	número de pacientes
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
p	número de significância estatística
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK	Proteínas quinases dependentes de fosfoinositol
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLC-1	Fosfolipase C-1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ácido ribonucléico
TMA	Tissue micro array
UICC	União internacional contra o câncer
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR1	Receptor tipo 1 do Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR2	Receptor tipo 2 do Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

%	per cento
Cm	centímetros
m	meses
N	número de pacientes
<	menor que
>	maior que
=	igual a
ng	nanogramas
nm	nanômetro
U	unidades
ml	mililitros

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Fatores prognósticos relacionados à metástase hepática.....	4
1.1.1	Número de lesões metastáticas hepáticas.....	6
1.1.2	Dimensões das metástases hepáticas.....	6
1.1.3	Margens cirúrgicas na ressecção hepática	7
1.1.4	Tempo livre de doença entre a ressecção do tumor primário e o aparecimento das lesões metastáticas hepáticas < que 1 ano.....	7
1.1.5	Nível do CEA sérico pré-ressecção hepática	8
1.1.6	Presença de doença metastática extra-hepática.....	8
1.2	Fatores prognósticos moleculares relacionados à metástase hepática	9
1.2.1	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	9
1.2.2	Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR)	12
2	OBJETIVO	16
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	17
3.1	Tipo de estudo.....	17
3.2	Métodos.....	17
3.3	Coleta de dados	18
3.4	Critérios de inclusão.....	18
3.5	Critérios de exclusão.....	18
3.6	Variáveis coletadas	19
3.7	Consentimento da comissão de ética e pesquisa.....	20
3.8	Análise imunoistoquímica	20
3.8.1	Tissue Micro Array (TMA).....	20
3.8.2	Imunoistoquímica.....	23
3.8.3	Interpretação das reações imunoistoquímicas.....	24
3.9	Análise estatística.....	27

4	RESULTADOS	28
4.1	Análise univariada dos resultados das variáveis clínicas e patológicas em relação ao prognóstico.....	32
4.2	Expressão do VEGF nas metástases hepáticas de câncer colorretal	37
4.3	Estudo da relação entre a expressão do VEGF no tecido tumoral com as variáveis clínicas e patológicas	39
4.4	Expressão do EGFR nas metástases hepáticas de câncer colorretal	42
4.5	Estudo da relação entre a expressão do EGFR com métodos imunoistoquímicos distintos	44
4.6	Estudo da relação entre a expressão do EGFR com as variáveis clínicas e patológicas.....	45
4.7	Análise multivariada dos resultados das variáveis clínicas, patológicas e imunoistoquímicas em relação ao prognóstico	48
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÕES	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo e representa um problema de saúde pública, pois é o segundo câncer mais prevalente. Representa o quarto tipo de câncer mais freqüente em homens e o terceiro em mulheres, sendo o risco acumulado de desenvolvimento de CCR ao longo da vida de 6 %. No Brasil, a estimativa é de 13.310 novos casos para homens e 14.800 novos casos para mulheres no ano de 2010 (Ministério da Saúde 2009).

Os métodos diagnósticos disponíveis atualmente possibilitam o rastreamento de indivíduos de alto risco de desenvolvimento de CCR, sua detecção precoce e cura. O rastreamento do CCR é viável e eficaz economicamente, mas sua aplicação não é disseminada e, ao diagnóstico, a maioria dos tumores encontra-se localmente avançada ou com metástases hepáticas (SPEIGHTS et al. 1999).

A incidência de metástases hepáticas de câncer colorretal é de 15% a 25% ao diagnóstico (FONG et al. 1996) e o desenvolvimento tardio dessas lesões no fígado pode ocorrer em até 50% dos pacientes inicialmente sem metástases (CHOTI e BULKLEY 1999). Estima-se, portanto, que cerca de metade dos pacientes portadores de CCR desenvolverão metástases hepáticas (STEELE e RAVIKUMAR 1989).

A sobrevida de pacientes com metástases hepáticas não tratadas varia de 5 a 19 meses, com média inferior a 9 meses (NAGORNEY et al. 1987) e a quimioterapia como tratamento exclusivo pode proporcionar uma sobrevida mediana de 15 meses (LISE et al. 1991; SHEINER e BROWER 1994).

O tratamento através das ressecções hepáticas de metástases de tumores colorretais começou a ser definido a partir dos estudos de WOODINGTON e WAUGH (1963), com taxa de sobrevida de 20% em 5 anos. BENGMARK e HAFSTROM (1969), publicaram um estudo com 40% de sobrevida em 5 anos. ADSON et al. (1984), relataram sobrevida de 28% em 5 anos nos pacientes submetidos à ressecção de metástases hepáticas de câncer colorretal. No estudo de SCHEELE e ALTENDORF-HOFMANN (1999), foram realizadas 434 ressecções de metástases hepáticas de câncer colorretal em período de 32 anos (1960 a 1992) com sobrevida de 32% em 10 anos e de 18% em 20 anos, com mortalidade operatória inferior a 5%. Apesar de não haver estudos randomizados, em pacientes passíveis de ressecção hepática, que compare quimioterapia exclusiva e ressecção de metástases hepáticas, estudos retrospectivos sugerem fortemente uma melhor sobrevida nos paciente submetido à cirurgia, tornando a ressecção hepática o tratamento padrão para metástases de câncer colorretal (ADSON et al. 1984; SCHEELE et al. 1991). Portanto, a ressecção cirúrgica é a única possibilidade de cura para o paciente com metástases hepáticas de CCR, embora 43% dos pacientes submetidos à ressecção desenvolverão nova recidiva sistêmica e hepática, sendo que apenas hepática em 20% (TRANBERG et al. 1994).

As recidivas hepáticas isoladas podem ser tratadas com a utilização cada vez mais freqüente de re-ressecções. Neste caso, observa-se sobrevida de 45% em 5 anos, incluindo pacientes submetidos a até três ressecções hepáticas (HUGHES et al. 1988; CHOTI e BULKLEY 1999).

Nos dias atuais, com o aprimoramento da técnica cirúrgica, avanços nos cuidados da anestesia e terapia intensiva, abordagem multidisciplinar com utilização

de quimioterapia neoadjuvante, embolização portal prévia para aumentar o volume dos segmentos hepáticos remanescentes e as ressecções programadas em dois tempos, todos estes adventos tornaram possível a abordagem de pacientes que eram considerados irressecáveis e também implicaram na melhora da sobrevida quando se compara séries históricas com as séries mais recentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Sobrevida em pacientes submetidos à ressecção hepática por metástase colorretal.

	SOBREVIDA A LONGO PRAZO		
	5 anos	10 anos	20 anos
SCHEELE et al. (1995)	39%	3%	18%
JAMISON et al.(1997)	27%	20%	
BISMUTH e ADAM (1998)	39%	20%	
FONG et al. (1999)	37%	22%	
NOURA et al. (2001)	49%		
CHOTI et al. (2002)	47%		
ABDALLA et al. (2004)	57%		
FIGUERAS et al. (2007)	42%	30%	

Hoje a indicação e a extensão da ressecção de metástases hepáticas são baseadas na análise da condição clínica do paciente, extensão da doença e na função hepática (LUPINACCI et al. 2007). Alguns estudos que investigaram possíveis fatores relacionados às metástases hepáticas de câncer colorretal, têm sido usados para predizer a presença de doença irressecável na laparotomia (JARNAJIN et al. 1999) e para selecionar pacientes que poderiam se beneficiar de uma cirurgia com intenção curativa (NORDLINGER et al. 1996). Deve-se ressaltar, no entanto, que o aspecto mais importante de todos esses estudos é que a ressecção hepática melhora a sobrevida a longo prazo. Portanto, é imperativo avaliar os fatores prognósticos para selecionar pacientes, inferir estimativas de sobrevida, delinear grupos de risco que

necessitem de terapia neoadjuvante ou adjuvante e eventualmente indicar ressecções hepáticas repetidas, pois estes fatores prognósticos podem interferir na evolução dos pacientes tratados de metástases hepáticas de carcinoma colorretal (MHCCR).

1.1 FATORES PROGNÓSTICOS RELACIONADOS À METÁSTASE HEPÁTICA

Vários estudos foram realizados com o propósito de identificar possíveis fatores prognósticos de sobrevida e também de selecionar pacientes utilizando um escore prognóstico. FONG et al. (1999) analisaram 1.001 pacientes submetidos à ressecção por MHCCR e, em um estudo multicêntrico em 85 instituições, NORDLINGER et al. (1996) avaliaram 1.568 ressecções durante 22 anos.

No estudo de FONG et al. (1999), foram identificados 5 fatores prognósticos para desenvolver um escore de risco nos pacientes submetidos à ressecção hepática por metástases colorretais:

- pacientes com mais do que 1 lesão metastática hepática;
- tumores maiores que 5cm;
- antígeno carcinoembrionário (CEA) pré-operatório maior que 200ng/ml;
- linfonodos comprometidos no tumor colorretal;
- tempo livre de doença entre a ressecção do tumor primário e o aparecimento das lesões metastáticas hepáticas menor que 1 ano;
- margens cirúrgicas positivas, presença de doença extra-hepática.

Para cada variável positiva soma-se 1 ponto (Tabela 2). A sobrevida foi de 40% em 5 anos quando até 2 fatores prognósticos eram positivos, porém quanto mais fatores, pior a sobrevida.

Tabela 2 – Escore prognóstico.

FATORES PROGNÓSTICOS X SOBREVIDA	
Fator prognóstico positivo	Sobrevida (5 anos)
0	60%
1	44%
2	40%
3	20%
4	25%
5	14%

Fonte: FONG et al. (1999).

O sistema proposto por NORDLINGER et al. (1996), classifica os pacientes como portadores de baixo, médio e alto risco e analisa a sobrevida em 2 anos de acordo com os seguintes dados:

- estadiamento do tumor primário;
- linfonodos comprometidos;
- tempo de aparecimento da metástase inferior 2 anos;
- número de metástase superior a 4;
- diâmetro da metástase maior que 5cm;
- nível do CEA superior a 30ng/ml;
- margem de ressecção inferior a 1cm;
- idade superior a 60 anos.

Para cada variável positiva soma-se 1 ponto. (Tabela 3).

Tabela 3 – Critérios de risco para pacientes com metástase hepática de câncer colorretal.

FATORES PROGNÓSTICOS		
Risco	Soma dos Pontos	Sobrevida (2 anos)
Baixo	0 a 2	79%
Médio	3 a 4	60%
Alto	5 a 7	43%

Fonte: NORDLINGER et al. (1996).

1.1.1 Número de lesões metastáticas hepáticas

A ressecção de metástases hepáticas solitárias de tumores colorretais está associada a 50% de sobrevida em 5 anos (KOKUDO et al. 2004; FIGUERAS et al. 2007).

FONG et al. (1999) associam sobrevida de 44% após a ressecção de metástase única. Estudos revelam que pacientes submetidos à ressecção de múltiplas lesões metastáticas hepáticas têm prognóstico reservado com sobrevida de 20% em 5 anos, mas aceitável quando comparada com outros tipos de câncer (GAYOWSKI et al. 1994) (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de Metástases Hepáticas X Sobrevida.

FONG et al. (1999)	FIGUERAS et al. (2007)
4 nódulos = 33%	1 nódulo = 45%
5 nódulos = 22%	até 4 = 39%
6 a 8 nódulos = 19%	4 ou mais = 30%
9 a 20 nódulos = 14%	6 ou mais = 24%

1.1.2 Dimensões das metástases hepáticas

Vários estudos reportam um pior prognóstico quando analisam a incidência de recorrência e sobrevida em metástases hepáticas de tumores colorretais maiores

que 5cm (SCHEELE et al. 1991; FONG et al. 1999). No estudo de SCHEELE e ALTENDORF-HOFMANN (1999), o tamanho das metástases foi fator independente de sobrevida global e livre de doença após a ressecção hepática. Alguns autores consideram o tamanho das lesões metastáticas menos importante e que não influenciaria o prognóstico (CHOTI et al. 2002; KATO et al. 2003).

1.1.3 Margens cirúrgicas na ressecção hepática

A obtenção de margens livres deve ser sempre perseguida pelo cirurgião e usualmente admite-se que se deve obter uma margem de pelo menos 1 cm de tecido normal (FONG et al. 1999). Muitos estudos têm identificado a margem da ressecção hepática livre de doença maior que 1 cm como um dos mais importantes fatores que influenciam a sobrevida global e livre de doença, e os autores consideram a impossibilidade de obtenção desta margem como uma contra indicação relativa da ressecção hepática (EKBERG et al. 1986; SCHEELE et al. 1995; SHIRABE et al. 1997; ELIAS et al. 1998). Entretanto, em uma recente publicação, HAMADY et al. (2006) questionaram essa margem de 1 cm e seus resultados demonstraram que a simples obtenção de margens livres, mesmo menores que 1 cm, não causou impacto significativo na sobrevida.

1.1.4 Tempo livre de doença entre a ressecção do tumor primário e o aparecimento das lesões metastáticas hepáticas inferior a 1 ano

Vários estudos têm demonstrado que as metástases sincrônicas (diagnosticada no mesmo momento do Tumor primário ou em um intervalo menor que 1 ano) estão relacionadas a pior prognóstico quando comparadas com os

tumores metacrônicos (diagnosticados após um intervalo superiores a 1 ano do tratamento do tumor primário) (SCHEELE et al. 1995; FONG et al. 1999). Por outro lado, outros autores não encontraram diferença estatística entre tumores sincrônicos e metacrônicos (VOGT et al. 1991). Em trabalho recente BOCKHORN et al. (2008) encontraram sobrevida similar entre os pacientes com metástases sincrônicas e metacrônicas tratados com ressecção hepática.

1.1.5 Nível do antígeno carcinoembrionário sérico pré-ressecção hepática

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é um marcador tumoral e está relacionado a tumores colorretais e seu prognóstico. Nível de CEA pré-ressecção hepática superior a 200 ng/ml, no estudo de FONG et al. (1999), teve significância estatística na análise univariada, mas não na análise multivariada, embora a probabilidade de morte tenha se mantido elevada. Resultados semelhantes foram observados por SUGAWARA et al. (2001), analisando 304 pacientes. Outros estudos demonstram que o nível pré-operatório de CEA é fator prognóstico independente adverso (NORDLINGER et al. 1996). Atualmente, não há unanimidade quanto a relação entre CEA e sobrevida, entretanto sabe-se que o nível pré-operatório de CEA, qualquer que seja, não contra-indica a ressecção hepática de metástases colorretais.

1.1.6 Presença de doença metastática extra-hepática

A presença de doença metastática extra-hepática concomitante com a metástase hepática mostrou-se significativa do ponto de vista estatístico na análise

univariada (FONG et al. 1999) e foi o fator prognóstico adverso com maior influência no estudo.

Recente estudo de ELIAS et al. (2006) demonstrou sobrevida de até dez anos após ressecção de metástases hepáticas associadas a ressecções de metástases extra-hepáticas em pacientes selecionados.

A presença de doença extra-hepática não é uma contra-indicação absoluta à hepatectomia, desde que esta seja passível de controle. SHAH et al. (2006) demonstraram que metástases pulmonares quando ressecadas completamente antes ou após hepatectomia podem apresentar resultados comparáveis a pacientes sem metástase extra-hepática.

1.2 FATORES PROGNÓSTICOS MOLECULARES RELACIONADOS À METÁSTASE HEPÁTICA

1.2.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Tanto as células normais, quanto as células neoplásicas dependem de adequado suprimento sanguíneo para obtenção de oxigênio e nutrientes e é graças à formação de redes vasculares que a célula garante crescimento e manutenção dos tecidos. A angiogênese é um processo complexo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de pré-existentes, rigidamente controlado por fatores estimuladores ou inibidores, na dependência das necessidades locais. Na angiogênese associada aos tumores sólidos os novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro (BERGERS et al.

2003) permitindo o desenvolvimento dos vasos sanguíneos ao redor do tumor o que é indispensável para o crescimento tumoral e invasão local.

Estudos clínicos demonstram que a angiogênese também contribui para o processo metastático, pois a medida que há expansão da vascularização, maior é a superfície para escape de células tumorais na circulação, processo esse que pode ser facilitado pela imaturidade dos novos vasos formados (LIOTTA et al. 1974). Desde a demonstração pioneira de FOLKMAN (1971), o crescimento tumoral é considerado angiogênese-dependente e numerosos fatores angiogênicos têm sido identificados como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), metaloproteinases da matriz (MMP), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), mas principalmente o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

O VEGF é o fator angiogênico que tem sido mais intensamente estudado, uma vez que além de atuar na neoangiogênese, aumenta a permeabilidade vascular (FOLKMAN et al. 1997).

Estudos sugerem que a hipóxia celular é o estímulo mais importante para regular a expressão do VEGF (FERRARA 2002). A hipóxia no tecido tumoral costuma ocorrer quando este está a 100-200nm distante de uma fonte vascular nutridora (HELMLINGER et al. 1997) e a sobrevivência do tumor depende da habilidade adaptativa em recrutar novos vasos sanguíneos através de fatores angiogênicos. Os tumores humanos que resistem à condição de hipóxia demonstram que se adaptaram a este ambiente na progressão tumoral. A célula normal em condições de hipóxia é induzida a ativar um fator transcricional chamado HIF (fatores induzidos por hipóxia), que são proteínas heterodiméricas, representadas por HIF1, HIF2 e HIF3 e que regulam mais de 70 gens alvos (BODDY et al. 2005). O

HIF aumenta a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), além de promover o aumento da expressão de enzimas glicolíticas (FIRTH et al. 1995; RYAN et al. 1998).

O VEGF é o fator chave dos processos fisiológicos de vasculogênese e angiogênese (JAIN 2003). O VEGF (também chamado de VEGF-A) é uma glicoproteína ligada à heparina pertencente a uma subfamília que inclui os fatores de crescimento VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (SHIBUYA 2001).

O VEGF liga-se a dois receptores principais: VEGFR1 (Receptor tipo 1 do fator de crescimento vascular endotelial) e o VEGFR2 (Receptor tipo 2 do fator de crescimento vascular endotelial). Cada um destes receptores possui: um domínio extracelular com regiões semelhantes à imunoglobulina; uma região transmembrana e um domínio intracelular tipo tirosino-quinase. O VEGFR1 tem maior afinidade ao VEGF do que o VEGFR2. Em contraste o VEGFR2 tem mais atividade tirosino-quinase quando estimulado pelo VEGF. A ativação do VEGFR1 não tem efeito direto na mudança do citoesqueleto (WALTENBERGER et al. 1994). Entretanto a ativação do VEGFR1 está implicada no aumento da expressão do plasminogênio ativado que está relacionado à degradação da matriz extracelular e migração celular (OLOFSSON et al. 1998). São conhecidos seis resíduos C-terminal do VEGFR1 incluindo 1169, 1213, 1242, 1309, 1327 e 1333, responsáveis pelos sítios de fosforilação (ITO et al. 1998; OLSSON et al. 2006). O sítio 1169 é implicado na ativação da fosfolipase C-1(PLC-1) que ativa a transdução de sinal da via da proteína-quinase mitógeno-ativada (MAP-K), que em última análise promove a sobrevivência celular (SAWANO et al. 1997). Vários estudos comprovam a

expressão do VEGF no tecido tumoral como fator prognóstico. SCHEELE e ALTENDORF-HOFMANN (1999) relataram que pacientes com CCR possuem níveis superiores de VEGF quando comparados a indivíduos saudáveis e que este está associado ao desenvolvimento de metástases e pior prognóstico. ABE et al. (2007) observaram que dos 27 pacientes submetidos à cirurgia colorretal por câncer, todos tinham aumento na expressão do VEGF no citoplasma, principalmente aqueles com comprometimento linfonodal e invasão angiolinfática. Estes resultados sugerem que a expressão do VEGF pode ser usada como um marcador da presença de metástase.

1.2.2 Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR)

O EGFR é uma glicoproteína da membrana plasmática celular, composta de um domínio de ligação extracelular lipofílico e um domínio intracelular de tirosina-quinase. É um membro da família dos fatores de crescimento e a ativação do complexo EGFR-tirosina-quinase tem sido identificado como um evento iniciador da cascata de sinalização intracelular levando à proliferação, sobrevivência, angiogênese e metastatização (KARI et al. 2003). A ativação da via de sinalização intracelular em resposta ao sinal molecular extracelular ocorre em quatro receptores conhecidos: EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005). São identificadas pelo menos 30 moléculas sinalizadoras extracelulares, que geralmente são pequenas proteínas secretadas pela célula no espaço intercelular, denominados fatores de crescimento. Todos os fatores de crescimento são sintetizados a princípio

como precursores ancorados à membrana e de forma subsequente são liberados da célula por proteólise (HYNES e LANE 2005; FINNEGAN e CAREY 2007).

A interação entre o receptor e o seu fator de crescimento inicia uma mudança na conformação do seu domínio extracelular de inativo para ativo e promove sua dimerização. Cada receptor homodimérico ou heterodimérico inicia uma complexa cascata de sinalização, que resulta na proliferação, diferenciação, migração, adesão e transformação da célula (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; HYNES e LANE 2005; SERGINA e ALTENDORF-HOFMANN 2007).

Uma das vias mais importante de sinalização intracelular é o da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005). Através de várias etapas intermediárias, a PI3K ativa a enzima AKT (proteína-quinase ativada pela PI3K), que então age sobre fatores de transcrição no núcleo, regulando a apoptose, expressão gênica e proliferação celular (MENDELSON e BASELGA 2000; YARDEN e SLIWKOWSKI 2001; GRANDIS e SOK 2004; HYNES e LANE 2005). Este evento ocorre no momento em que há estimulação do EGFR resultando em fosforilação dos resíduos de tirosina que são necessários para a ligação da PI3K ao receptor, desencadeando a fosforilação da fosfatidilinositol de membrana. Isto recruta as quinases dependentes de fosfoinositol 1 e 2 (PDK 1e 2), capazes de fosforilar e ativar o AKT (BELHAM et al. 1999). YANO et al. (1998) mostraram que a PDK1 fosforila o AKT na treonina 308, sendo esta fosforilação dependente de cálcio, e a PDK2 fosforila na serina 473, parecendo que a fosforilação nos dois sítios é necessária para a completa ativação do AKT (COFFER e WOODGETT 1998; DATTA et al. 1999). Estando a via da PI3K ativada, a morte celular é bloqueada por

vários mecanismos através de regulação de proteínas envolvidas no processo da apoptose (COFFER e WOODGETT 1998; DOWNWARD 1998). A via é regulada negativamente por uma fosfatase (PTEN), capaz de desfosforilar os resíduos de fosfatidil-inositol-trifosfato, já tendo sido mostrado que sua deficiência leva a um aumento na fosforilação e na atividade da AKT (KANAMORI et al. 2001).

Nas células tumorais, a família de receptores ErbB é ativada por vários mecanismos, incluindo a mutação, a superexpressão e produção autócrina e parácrina dos fatores de crescimento. Na estimulação parácrina dos receptores ErbB, os fatores de crescimento são liberados pelas células do estroma, enquanto que a estimulação autócrina resulta da liberação dos fatores de crescimento ancorados na membrana celular (HYNES e LANE (2005).

O aumento da expressão do EGFR é freqüente em tumores cerebrais, sendo encontrada em 40% dos gliomas. É também detectado nas lesões pré-malignas do epitélio oral, pulmão, próstata e colo uterino (GRANDIS e SOK 2004). Na literatura há estudos em câncer colorretal, investigando a expressão do EGFR no tumor primário e os resultados variam de 16%, para o câncer colorretal em estágios iniciais, a 97% nos avançados (SCARTOZZI et al. 2004; SPANO et al. 2005). BRALET et al. (2005) observaram a expressão do EGFR em 95% dos tumores colorretais de 40 pacientes e de 79% das metástases hepáticas de câncer colorretal em 51 pacientes operados. GOLDSTEIN e ARMIN (2001) observaram correlação entre a expressão do EGFR em linfonodos metastáticos com pior sobrevida.

MENDELSON (1990) considerou que seria possível inibir a proliferação de células neoplásicas através do bloqueio da ativação do EGFR, pois as células normais são menos sensíveis a inibição do EGFR. Em virtude da expressão do

EGFR em vários tipos de câncer e do conhecimento no mecanismo molecular e funcional, anticorpos monoclonais quiméricos como o cetuximabe, inibidor competitivo alvo do domínio extracelular do EGFR, foram desenvolvidos (THOMAS e GRANDIS 2004).

Apesar de terem mecanismos distintos de ativação, culminando na ativação da complexa cascata de sinalização intracelular, promovendo a proliferação tumoral, há uma relação muito importante entre o VEGF e o EGFR: a via de sinalização do VEGF é estimulada pela expressão do EGFR e inversamente, a estimulação do VEGF independente do EGFR, parece contribuir para a resistência no tratamento com moléculas-alvo anti-EGFR. Portanto, a inibição destes dois alvos moleculares poderá aumentar a resposta ao tratamento oncológico, superando a resistência a inibidores do EGFR. Estudos têm mostrado que inibidores do VEGF e do EGFR podem ter efeitos aditivos e que a inibição combinada é efetiva em células resistentes a inibidores do EGFR. Na última década, o conceito de tratamento com terapia-alvo tem sido introduzido na prática clínica e um melhor conhecimento biológico molecular é necessário. Portanto, O VEGF e o EGFR se apresentam como dois alvos biológicos interessantes a serem estudados devido a sua aplicação na oncologia atual. (CIARDIELLO et al. 2006.)

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar alterações da expressão imunoistoquímica das proteínas VEGF e EGFR em metástases hepáticas de pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal submetidos à ressecção e avaliar a sua relação com o prognóstico.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo longitudinal

3.2 MÉTODOS

Foram avaliados os prontuários de 85 pacientes submetidos à ressecção hepática por metástase de CCR no Hospital do Câncer A.C.Camargo no período compreendido entre setembro de 1999 à outubro 2006, entretanto após a seleção inicial dos casos foram excluídos 2 pacientes, tendo como causas da exclusão material insuficiente para análise e prontuário não encontrado. Foram estudados 83 pacientes e as variáveis de interesse foram a expressão imunoistoquímica de VEGF e EGFR nas metástases hepáticas. As variáveis de controle foram: idade, sexo, localização do tumor primário, tamanho do tumor primário, presença de linfonodos comprometidos, grau histológico, CEA pré-ressecção hepática, realização de quimioterapia neoadjuvante, tamanho das metástases hepáticas, quantidade de metástases hepáticas, lesão sincrônica ou metacrônica, metástase lobar ou bilobar,

Foram armazenados em banco de dados os possíveis fatores prognósticos e analisada a relação entre as variáveis e o risco de recidiva nos pacientes submetidos a ressecções hepáticas por metástases do CCR durante o seguimento mínimo de 1 ano.

3.3 COLETA DE DADOS

Os dados clínicos e anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade:

- a) confirmação de metástase hepática de adenocarcinoma de cólon ou reto;
- b) margens da ressecção hepática livres de neoplasia;
- c) disponibilidade de material conservado em parafina para estudo imunoistoquímico.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes com:

- a) material arquivado em parafina inadequado para a elaboração de novos cortes para imunoistoquímica.
- b) margens cirúrgicas comprometidas por doença neoplásica

3.6 VARIÁVEIS COLETADAS

- a) Variáveis demográficas e clínicas, compreendendo os itens apresentados a seguir: 1) idade; 2) sexo masculino ou feminino; 3) localização do tumor primário: cólon ou reto, definida pela descrição do exame endoscópico anotado no prontuário médico. Considerado reto o segmento até 12 cm da margem anal (NELSON et al. 2001); 4) realização de quimioterapia neoadjuvante: sim ou não; 5) nível sérico do antígeno carcinoembrionário (CEA) pré-hepatectomia; 6) tempo de aparecimento da metástase hepática: sincrônica ou metacrônica; 7) tamanho, número das lesões hepáticas e localização unilobar ou bilobar. 8) necessidade de transfusão: sim ou não. 9) tipo de cirurgia: hepatectomia menor (até 2 segmentos hepáticos); hepatectomia maior (3 ou mais segmentos hepáticos). 9) complicações intra e pós-operatórias.
- b) Variáveis anatomopatológicas, compreendendo os itens a seguir: 1) estadiamento TNM: utilizou-se a classificação TNM com base nos dados obtidos dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos. A classificação foi feita de acordo com a última edição do TNM, proposta pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC); 2) grau histológico do tumor: utilizou-se a classificação padronizada no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, adaptada para três categorias: grau 1: bem diferenciado; grau 2: moderadamente diferenciado; grau 3: pouco diferenciado.

3.7 CONSENTIMENTO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA

Esse projeto foi submetido a apreciação e aprovado pelas comissões de ética e pesquisa do Hospital AC. Camargo, sendo aprovado.

3.8 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

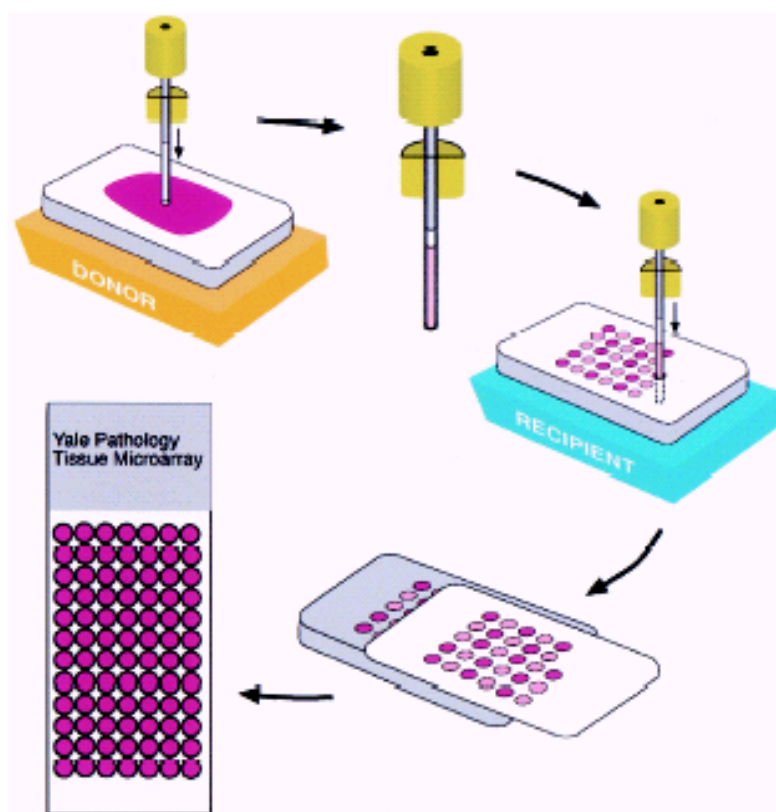
3.8.1 Tissue Micro Array (TMA)

Os blocos de parafina contendo fragmentos de metástases hepáticas de câncer colorretal e tecido hepático normal foram selecionados para a realização de “Tissue Microarray” (TMA). Desde a descrição pioneira de KONONEN et al. (1998), vários trabalhos científicos envolvendo a utilização do TMA para estudo de marcadores tumorais, mostrando a versatilidade e menor custo do “microarray” na avaliação das amostras teciduais tem sido publicado (BUBENDORF et al. 2001; RESNICK et al. 2004).

Utilizando agulhas de aço, biópsia tecidual é realizada em áreas representativas previamente escolhidas dos blocos de parafina (doadores). Após a realização da punção, o tecido é disposto em um bloco receptor (Figura 1). Um dispositivo com precisão digital é o responsável pela realização deste procedimento, fazendo com que o material seja disposto de forma ordenada e precisa. O bloco receptor pode ser composto por dezenas ou milhares de amostras de tecidos dependendo do diâmetro utilizado para a realização da biópsia (agulha) (Figura 2).

Os cortes da amostra podem ser corados com hematoxilina-eosina e podem ser utilizados paralelamente para a detecção de DNA, RNA ou alvos protéicos

utilizando hibridização *in situ* (com fluorescência ou reação cromogênica) ou imunistoquímica. Isto permite analisar marcadores tumorais na mesma amostra utilizando um bloco apenas, podendo ser realizada correlação morfológica, genética e fenotípica. Isto permite que as comparações possam ser realizadas de maneira homogênea, uma vez que amostras do mesmo núcleo são utilizadas (KONONEN et al. 1998).



Fonte: Kononen J et al. (1998)

Figura 1 - Representação esquemática da punção e transferência das áreas selecionadas do bloco doador para o bloco receptor – “tissue microarray”.

Para o presente estudo foi construído um bloco de TMA (Beecher Instruments, Silver Springs, USA), cada um contendo 166 “cores” (83 amostras) de

1mm. As regiões a serem amostradas para a confecção do bloco de TMA foram selecionadas por um patologista que orientou a confecção do bloco final de TMA. O TMA foi construído utilizando o Manual Tissue Arrayer I, aparelho fabricado e adquirido pela Beecher Instruments Inc.

Com o bloco de TMA pronto, foram obtidos cortes de 3 μ m de espessura, colhidos em lâminas com adesivos especiais para a técnica (Instrumedics Inc.).

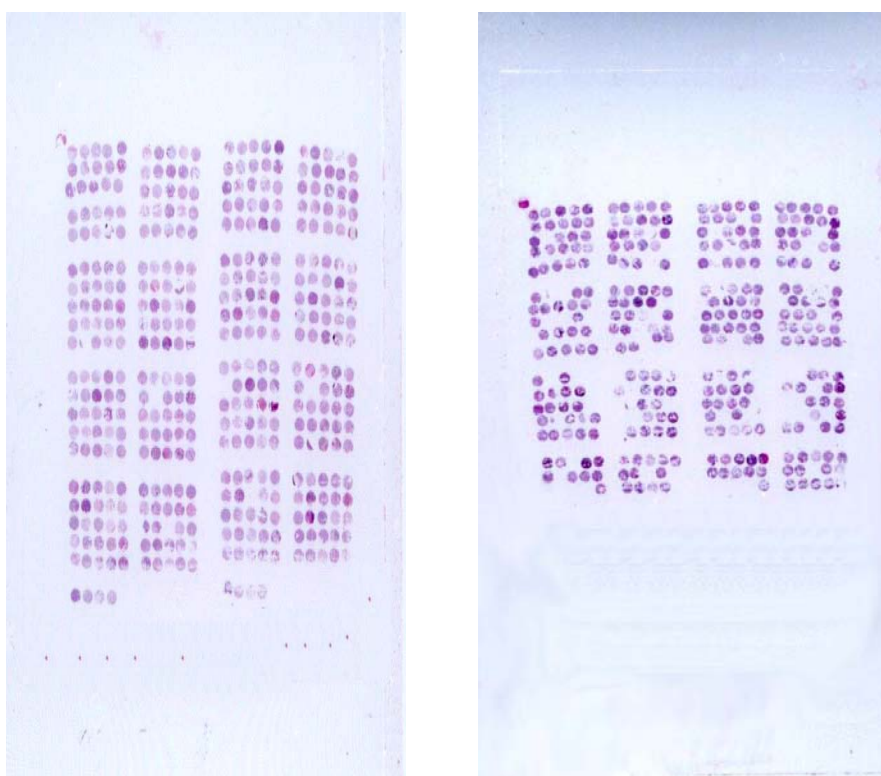


Figura 2 - Aspecto das lâminas receptoras (cada “core” corresponde a um caso ou tecido a ser estudado).

3.8.2 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas no Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo.

As regiões a serem amostradas para a confecção do bloco de TMA foram selecionadas por um único patologista que orientou a confecção do bloco final de TMA.

Duas lâminas de cada bloco de TMA, com cortes em dois níveis e com 40 cortes de diferença entre elas, foram submetidas às reações de imunoistoquímica. Os cortes no bloco foram realizados com micrótomo manual e transferidos em fita adesiva para as lâminas adesivas especiais (Intrumentic Inc. Hackensack, NJ, USA). As reações foram sempre acompanhadas de controle, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo primário.

As reações de imunoistoquímica foram realizadas pela técnica de polímero sem biotina (Advance) utilizando o anticorpo primário: Dako® para VEGF e EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor – NCL-EGFR mouse monoclonal antibody, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK).

Resumidamente,

- 1- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente;
- 2- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi). Lavagem em água corrente por 5 minutos; Bloqueio da peroxidase

endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;

- 3- Lavagem em PBS;
- 4- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 5- Incubação do anticorpo primário por 2 horas à temperatura ambiente (Ta) em câmara úmida;
- 6- Lavagem em PBS;
- 7- Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link -DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 8- Lavagem em PBS;
- 9- Incubação com Polímero (Advance HRP enzyme- DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 10- Lavagem em PBS;
- 11- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia);
- 12- Lavagem em água corrente;
- 13- Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 14- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 15- Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente.

3.8.3 Interpretação das Reações Imunoistoquímicas

A análise da expressão imunoistoquímica das proteínas VEGF E EGFR foi realizada quantitativamente através da leitura automatizada pelo ACIS III (DAKO,

Carpinteria, CA, EUA). As lâminas foram escaneada no modo citoplasma para VEGF e membrana para EGFR, e analisadas por meio de imagem magnificada, campo por campo, que permite discriminação do detalhe histológico (Figura 3).

Os detalhes da técnica de escaneamento e quantificação da intensidade podem ser avaliados no site do fabricante (<http://www.chromavision.com>). A análise das reações foi realizada através do número absoluto obtido pela média de densidade óptica do “core” estudado, marcado pelo patologista, que foi dividido pelo número de “background” (considerado como densidade negativa), e realizado uma média entre as quatro amostras de cada caso. Foram consideradas para análise quando duas ou mais amostras informativas foram registradas. Excluiu-se da análise quando apenas uma amostra das quatro de cada caso apresentou dados informativos.

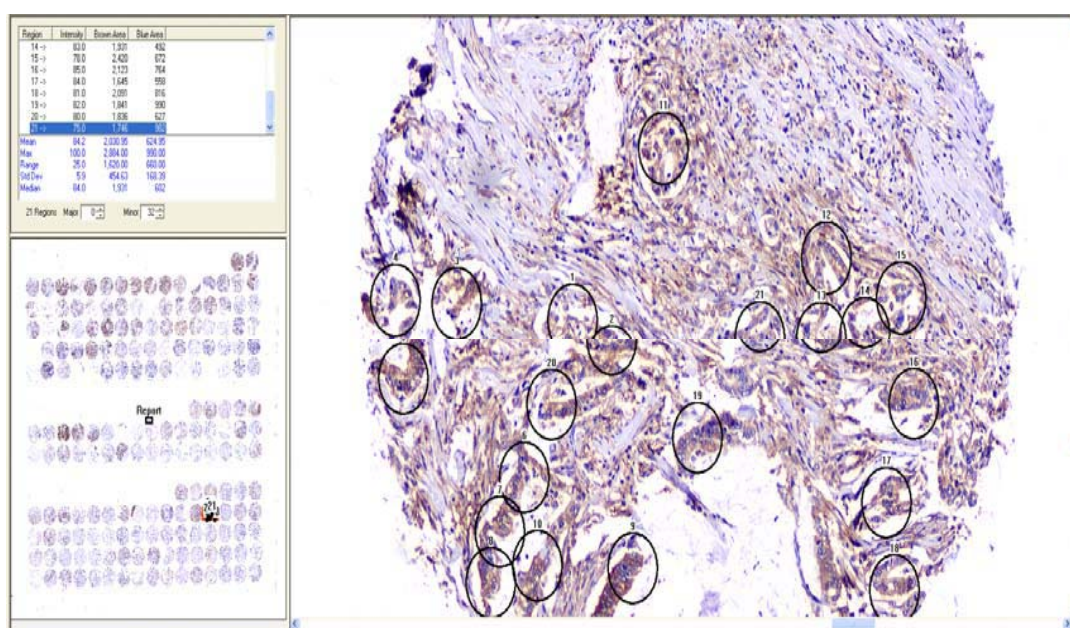


Figura 3 - Aspecto da imagem do programa utilizado, em detalhe a marcação das áreas de interesse (focos de neoplasia).

Para o EGFR, além da leitura automatizada pelo ACIS III, foi utilizada a interpretação subjetiva da expressão imunoistoquímica na membrana. Para efeito de análise da marcação em membrana, o resultado desta expressão foi realizada de acordo com as regras do teste reconhecido pela Food and Drug Administration para o estudo do HER2 (HANNA et al. 2007; WOLFF et al. 2007) como demonstrado na Tabela 5.

A análise subjetiva do EGFR foi avaliada através da intensidade da marcação das células tumorais, utilizando o mesmo modelo padronizado para leitura da intensidade no câncer de mama, divididas em quatro categorias:

- 0 nenhuma marcação;
- 1+ marcação com intensidade fraca, em parte de sua membrana, em menos de 10% das células;
- 2+ marcação completa de membrana de intensidade fraca a moderada em mais de 10% das células e em menos de 30% das células;
- 3+ marcação de intensidade forte em mais de 30%

Tabela 5 - Classificação da expressão protéica de EGFR na membrana.

ESCORE	PADRÃO DE COLORAÇÃO
0	Nenhuma coloração é observada nas células neoplásicas invasivas
1+	Coloração fraca e incompleta da membrana em qualquer proporção de células neoplásicas invasivas ou coloração fraca e completa em menos de 10% das células neoplásicas invasivas
2+	Coloração de membrana completa, não uniforme ou coloração fraca, mas com óbvia distribuição circunferencial em no mínimo 10% das células ou intensa e completa em 30% ou menos das células
3+	Coloração forte e completa da membrana observada em mais de 30% das células tumorais

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas com auxílio do programa estatístico “SPSS 15.0 for Windows”.

A caracterização da amostra foi realizada por meio da estatística descritiva. Utilizou-se a análise da curva ROC para a determinação do melhor ponto de corte para a expressão dos marcadores biomoleculares obtidas pelo ACIS. Para tanto, considerou-se o óbito em 60 meses como o evento de estratificação. As associações entre as variáveis categóricas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram empregados para se comparar os valores medianos de expressão dos marcadores biomoleculares e as diversas variáveis. O coeficiente de Spearman foi utilizado para as análises de correlação.

As taxas de sobrevida global em 5 anos foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier, sendo as curvas de sobrevida comparadas pelo teste de log rank. O tempo de seguimento foi calculado a partir da data da primeira cirurgia até a data da última informação objetiva na atualização dos dados. Para a identificação dos fatores de risco independentes para o óbito empregou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox. Verificou-se a proporcionalidade de risco ao longo do tempo através do gráfico *log minus log*. Para todos os testes estatísticos estabeleceu-se o nível de significância em 5%.

4 RESULTADOS

Foram estudados 83 pacientes submetidos à ressecção hepática por metástases de câncer colorretal. A idade variou entre 36 a 76 anos com média de 58,5 anos. Quarenta e quatro (53%) pacientes do sexo feminino e 39 (47%) do sexo masculino.

Quanto à localização do tumor primário, 45 pacientes possuíam tumores de cólon (54,2%) e 38 do reto (45%).

A presença de linfonodos comprometidos identificados na peça após a ressecção do tumor primário foi observado em 48 (57,8%) pacientes. O dado não estava disponível em casos 7 (8,4%).

Quanto ao grau histológico do tumor primário, 9 tumores foram considerados bem diferenciados (10,8%); 54, moderadamente diferenciados (65,1%); e 3, pouco diferenciados (3,6%). 17 tumores não tinham essa variável disponível no prontuário médico (20,5%).

A média do nível sérico do CEA pré-ressecção hepática foi de 64,57 ng/ml. O valor mínimo foi de 1 e o máximo de 1100 ng/ml. Esta variável não estava disponível em 22 casos (26,5%).

Vinte e quatro pacientes (28,1%) receberam quimioterapia neoadjuvante, 18 pacientes baseada em oxalplatina (21,7%), 2 em irinotecano e para 59 pacientes (71,1%) esta variável não estava disponível no prontuário.

Em relação ao tamanho das metástases hepáticas, 36 (43,4%) pacientes tinham metástases menores que 3 cm, enquanto em 47 (56,6%), as metástases eram

maiores que 3 cm. O tamanho mínimo foi 1 cm e máximo 12 cm. A média do tamanho das metástases neste estudo foi de 4,2 cm.

Na avaliação do número de lesões metastáticas, 38 pacientes tinham apenas 1 lesão (45,8%), enquanto 25 (30,1%) apresentavam 2 lesões e 13 (15,7%), 3 lesões. Neste estudo um paciente era portador de 6 lesões metastáticas.

A maioria dos pacientes (70%) apresentava lesões hepáticas em apenas um lobo hepático (unilobar).

Quanto ao aparecimento das metástases hepáticas, em 42 (50,6%) pacientes foi sincrônico e em 41(49,4%), metacrônico.

Em relação às cirurgias realizadas, consideramos a ressecção hepática maior (quando 3 ou mais segmentos são ressecadas) e ressecção hepática menor (até 2 segmentos). Neste estudo foram realizadas 34 hepatectomias menores (40,4%) e 49 hepatectomias maiores (59,6%).

Houve 15% de complicações cirúrgicas, a maioria fístula biliar benigna e de resolução clínica favorável. Em relação aos dias de internamento, o tempo mínimo foi de 3 dias e máximo de 60, com uma média de 9 dias. Apenas 16 (19,3%) pacientes foram submetidos à transfusão de concentrado de hemácias, enquanto a maioria não necessitou (Tabela 6).

Tabela 6 – Características clínicas e patológicas dos pacientes estudados relacionado ao tumor primário.

Variável	n (%)
Idade	
<60 anos	45 (54)
>60 anos	38 (46)
Sexo	
Masculino	39 (47)
Feminino	44 (53)
Localização do primário	
Cólon	45 (54,2)
Reto	38 (45,8)
Linfonodos positivos	
Não	28 (33,7)
Sim	48 (57,8)
Tipo de Cirurgia	
maior	49 (59,6)
menor	34 (40,4)
Número de metástases	
1	38 (45,8)
>1	45 (54,2)
Tamanho das metástases	
< /= 3cm	36 (43,4)
> 3cm	47 (56,6)
Doença bilobar	
Não	58 (70,0)
Sim	25 (30,0)
Doença sincrônica	
Não	42 (50,6)
Sim	41 (49,4)

A sobrevida global estimada da população estudada em 36 meses é de 73,3% e em 5 anos de 58%.

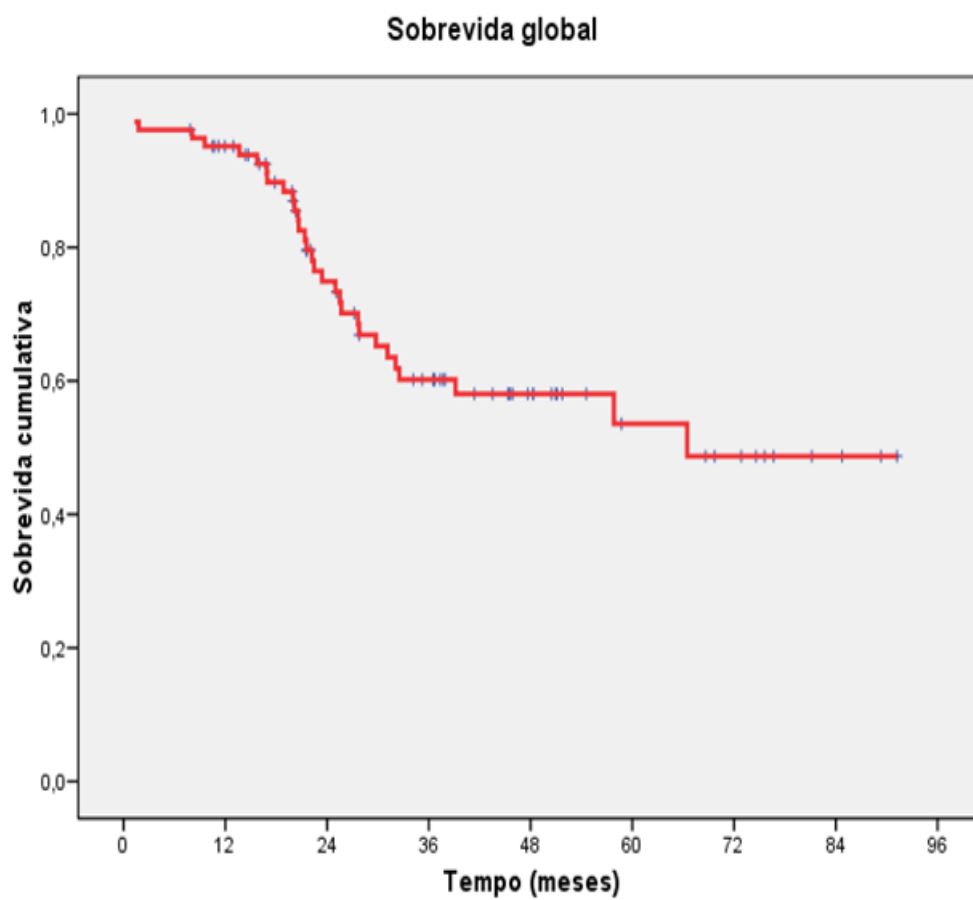


Figura 4 - Sobrevida global

A sobrevida livre de doença estimada da população estudada em 36 meses foi de 63,3% e em 5 anos de 40,8%.

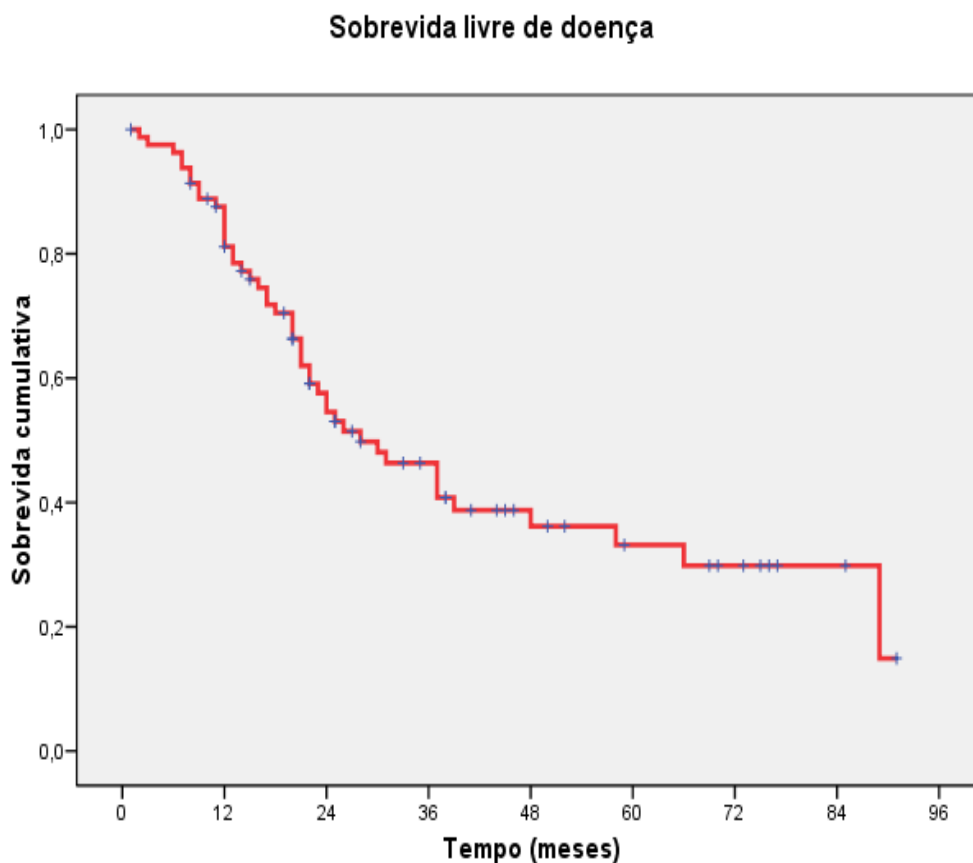


Figura 5-Sobrevida livre de doença.

4.1 ANÁLISE UNIVARIADA DOS RESULTADOS DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS EM RELAÇÃO AO PROGNÓSTICO

Na análise univariada, idade, sexo, localização do tumor primário, neoadjuvância, metástase sincrônica ou metacrônica, tipo de cirurgia, não se mostraram significativos em relação à sobrevida dessa população estudada. Neste estudo, a presença de até duas metástases, estava relacionada com melhor sobrevida livre de doença e com melhor sobrevida global. Além disso, o CEA inferior a 80 ng/ml, lesão metastática menor que 3 cm e doença unilobar, apresentaram

significado estatístico com melhor sobrevida global. As Figuras (6 a 10) abaixo demonstram a representação gráfica dessas variáveis sobre a sobrevida.

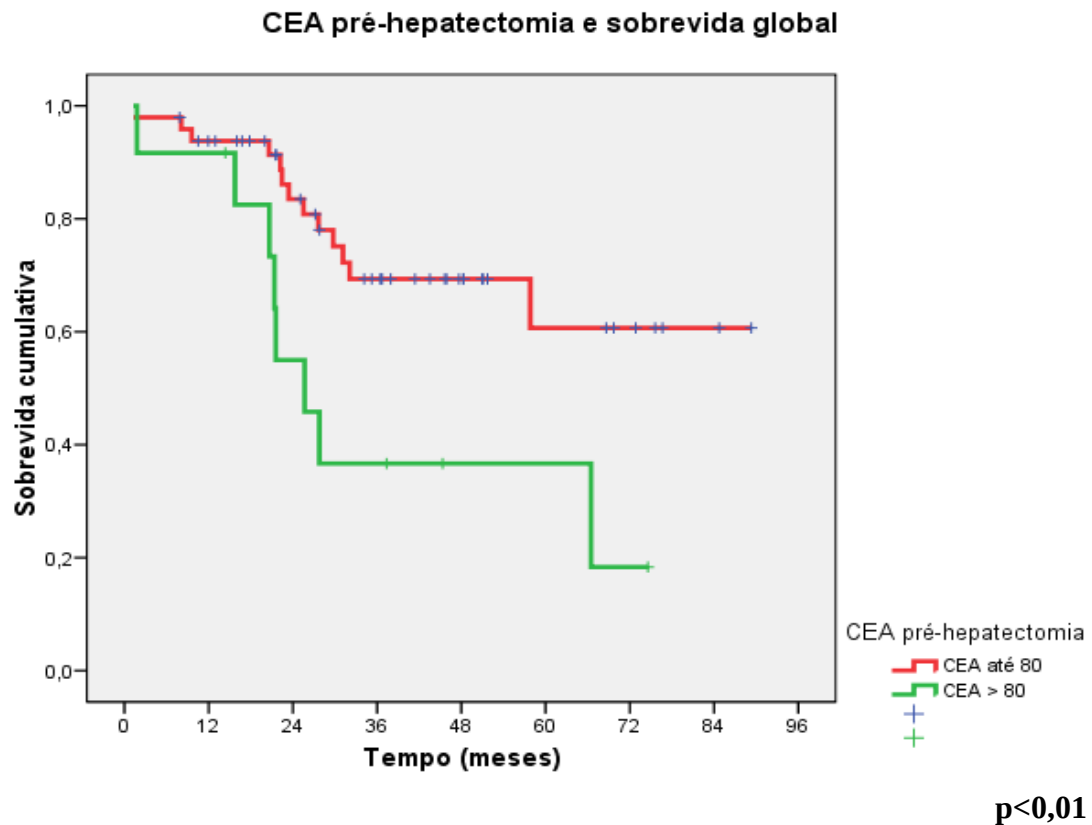
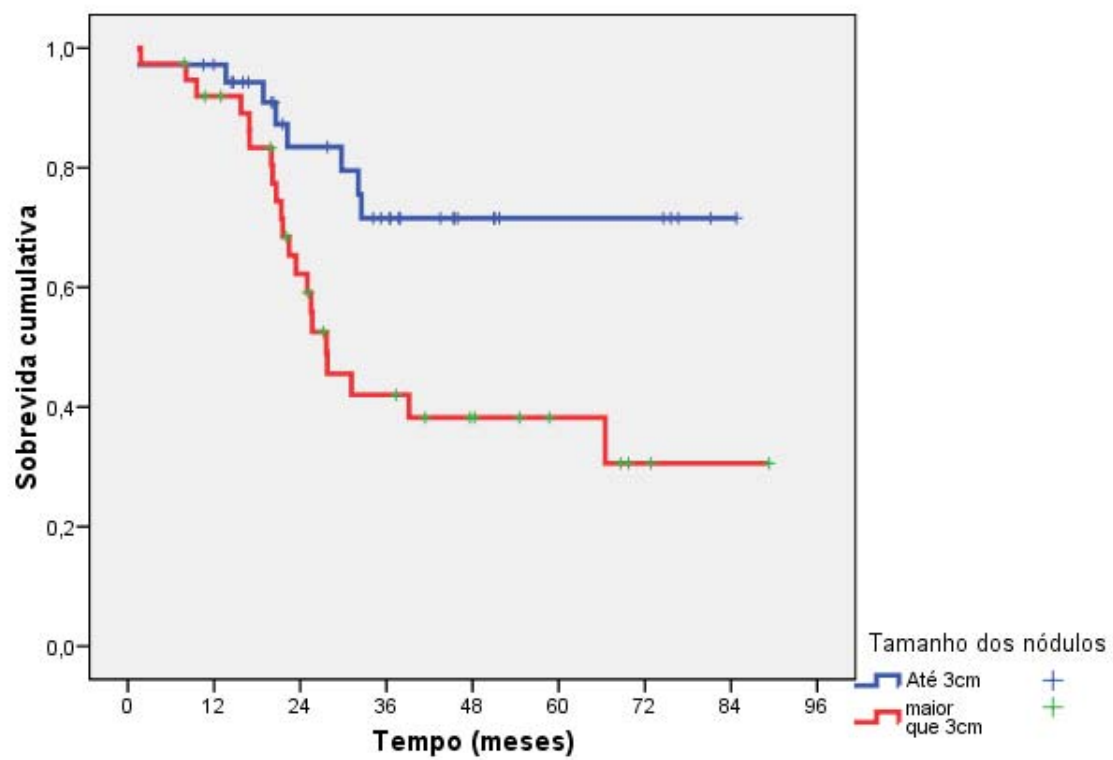


Figura 6 - Gráfico da sobrevida global em função do valor sérico do antígeno carcinoembrionário (CEA) pré-hepatectomia.

Tamanho dos nódulos e sobrevida global



p<0,007

Figura 7 - Gráfico mostrando o impacto da dimensão das metástases com a sobrevida.

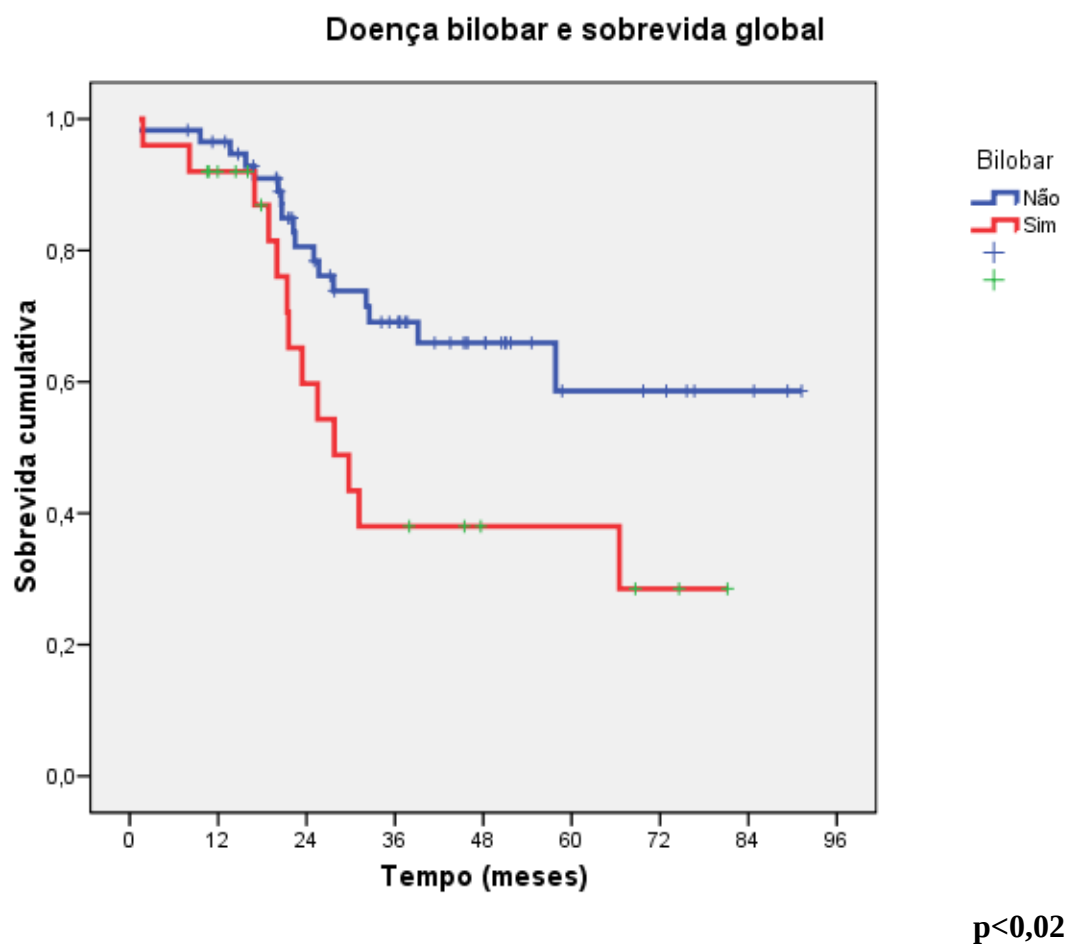
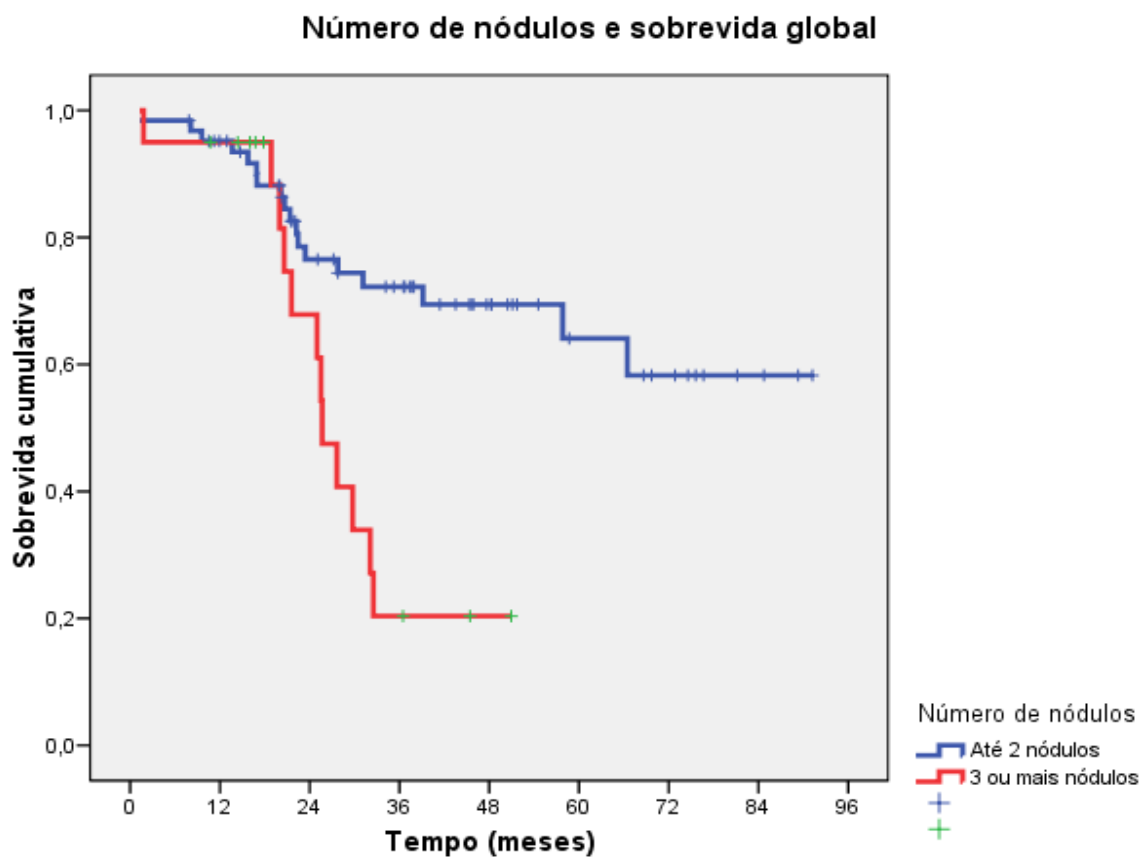


Figura 8 - Gráfico da sobrevida global em função da presença de doença bilobar.



p<0,001

Figura 9 - Gráfico mostrando o impacto do número de nódulos na sobrevida global.

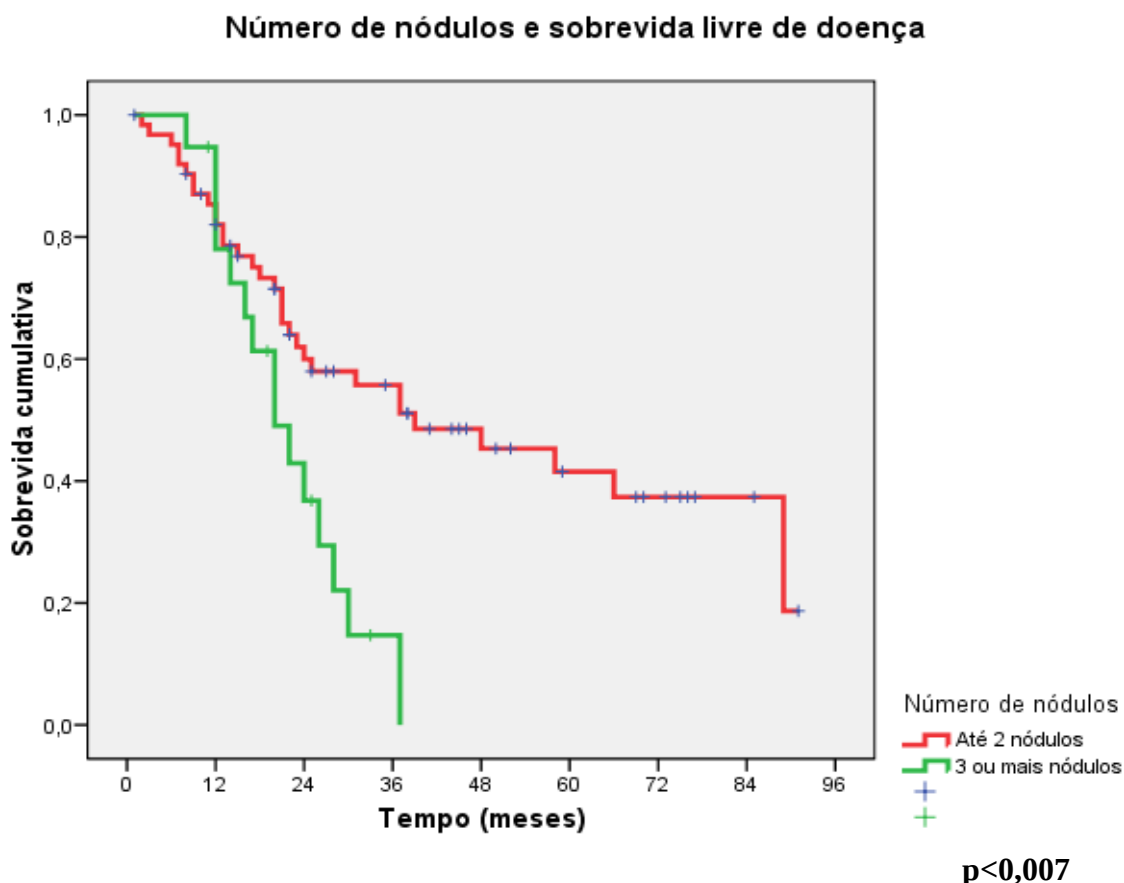


Figura 10 - Gráfico mostrando o impacto do número de lesões metastáticas na sobrevida livre de doença

4.2 EXPRESSÃO DO VEGF NAS METÁSTASES HEPÁTICAS DE CÂNCER COLORRETAL

Para a análise da expressão do VEGF foi utilizado o método automatizado (ACIS III) que avalia o grau de intensidade (variando de 0 a 200) do marcador no tecido estudado. Quase todas as amostras, 96,4%, expressavam o marcador VEGF no citoplasma e após obter média de expressão de duas amostras, foi obtido um valor absoluto para análise dos resultados, conforme descrição prévia na sessão métodos. Foi considerada baixa expressão quando o valor obtido foi até 90 e alta expressão quando este valor encontrava-se acima de 90. A expressão do VEGF

apresentou um valor de intensidade mínimo de 0, valor máximo de 144,3 e média de 56,2.

Neste estudo a expressão imunoistoquímica positiva do VEGF no citoplasma se associou a pior taxa de sobrevida global na análise univariada (Tabela 7).

Tabela 7 - Probabilidade de sobrevida em 5 anos de acordo com a expressão do VEGF no tecido tumoral.

Variável	Categorias	Sobrevida global (5 anos)		
		n	%	valor de P
VEGF (ACIS)*	Baixa expressão (até 90)	77	54,9	0,031
	Alta expressão (> 90)	6	33,3	

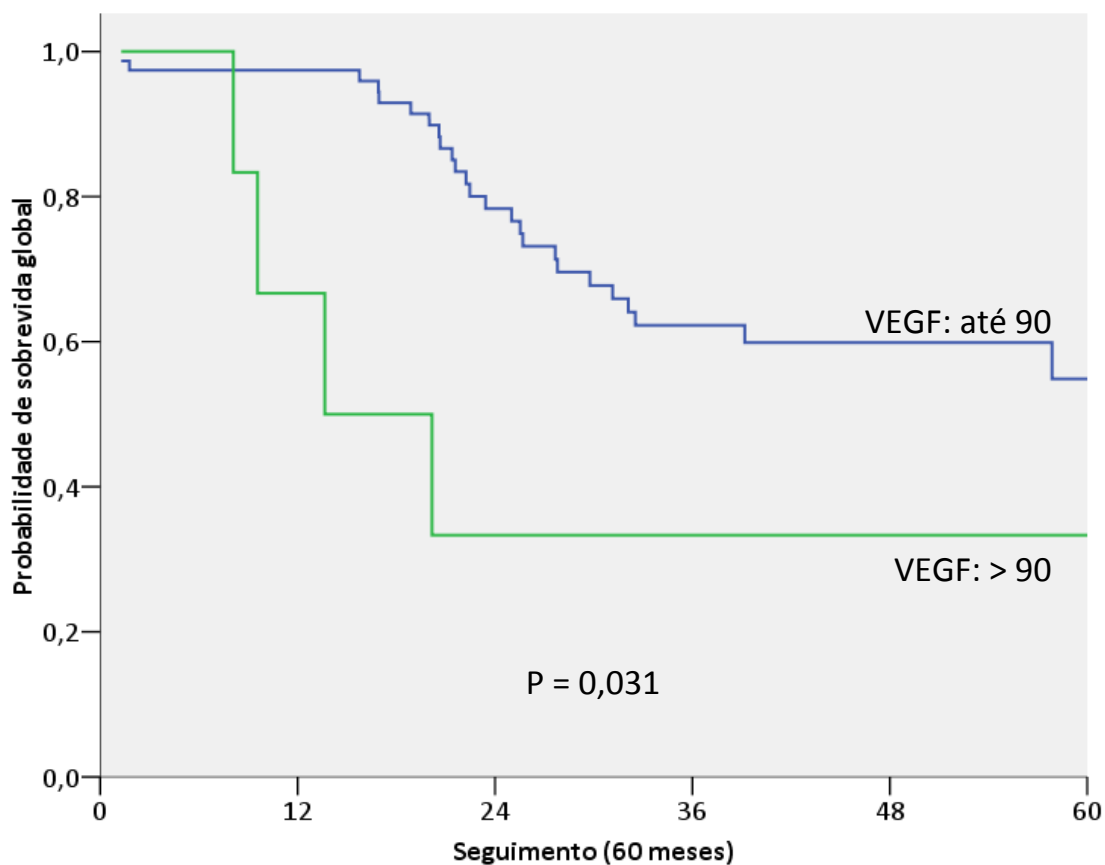


Figura 11 – Expressão do VEGF x Sobrevida Global

4.3 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO VEGF NO TECIDO TUMORAL COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

Foi realizada avaliação estatística da correlação entre o nível de expressão do VEGF com as seguintes variáveis: idade, sexo, grau histológico, localização do tumor primário, tamanho do tumor primário, linfonodos comprometidos, CEA pré-hepatectomia, metástase hepática sincrônica, tamanho da maior metástase hepática e quantidade de nódulos hepáticos metastáticos.

Na população estudada a expressão do VEGF foi maior nos pacientes com idade superior a 60 anos com expressão mediana 69,6, e nos pacientes até 60 anos, de 51,5, e esta diferença demonstrou resultado estatisticamente significativo na análise univariada. Apesar da análise pelo coeficiente de Spearman ter sido concordante entre as variáveis, a magnitude da correlação foi fraca.

O marcador VEGF não demonstrou associação com as outras variáveis clínicas e histopatológicas deste estudo (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação dos valores medianos de expressão de VEGF obtidos pelo ACIS de acordo com diversas variáveis.

Variável	Categoria	N	VEGF (valor mediano)	valor de P
Sexo	Feminino	39	56,4	W: P=0,855
	Masculino	44	55,1	
Idade	Até 60 anos	49	51,5	W: P=0,002
	> 60 anos	34	69,6	
Localização do tumor	Cólon	45	61,8	W: P=0,235
	Reto	38	55,2	
Tamanho do tumor primário	T2	15	65,0	W: P=0,889
	T3	52	55,2	
	T4	8	61,7	
Status linfonodal	N0	28	63,4	W: P=0,739
	N1 – N2	48	54,4	
Grau histológico do tumor	Grau 1	9	57,4	W: P=0,801
	Graus 2 e 3	57	54,3	
CEA pré-hepatectomia	Até 80	51	56	W: P=0,546
	>80	12	65,3	
Metástase sincrônica	Não	39	64,2	W: P=0,824
	Sim	42	53,5	
Tamanho da maior metástase	Até 3 cm	36	46,6	W: P=0,122
	> 3 cm	47	64,3	
Nº de nódulos metastáticos	Até 2	63	59,1	W: P=0,275
	> 2	20	54,4	

4.4 EXPRESSÃO DO EGFR NAS METÁSTASES HEPÁTICAS DE CÂNCER COLORRETAL

Para a expressão do EGFR foram utilizados dois métodos para a análise: um método automatizado (ACIS III), que avalia o grau de intensidade do marcador no tecido estudado, e outro através da interpretação subjetiva da expressão imunohistoquímica na membrana, conforme descrição prévia na sessão métodos.

A expressão do EGFR foi de 97,6% nas metástases hepáticas e apresentou um valor de intensidade mínima de 0, valor máximo de 173 e média de 86,2. Foi considerada baixa expressão até 95 e alta expressão quando acima de 95. Neste estudo, pelo método ACIS (automatizado), 53 (56%) pacientes apresentaram baixa expressão e 30 (47%), alta expressão.

Com relação à análise do EGFR, pelo método subjetivo (não automatizado), houve expressão nas metástases hepáticas em 57 (67,5%) pacientes. Vinte e sete (32,7%) pacientes apresentavam tumores com expressão negativa, trinta e dois (38,6%) pacientes com expressão baixa, enquanto quinze (18,1%) apresentavam expressão moderada, e nove (10,8%), expressão forte para EGFR.

Tabela 9 - Probabilidades de sobrevida global em 5 anos de acordo com a expressão do EGFR.

Variável	Categorias	Sobrevida global (anos)		
		n	%	Valor de P
EGFR (ACIS)*	Baixa expressão (até 95)	53	56,0	0,230
	Alta expressão (> 95)	30	47,0	
EGFR	Negativo – Fraco	59	58,1	0,072
	Moderado – Forte	24	39,6	

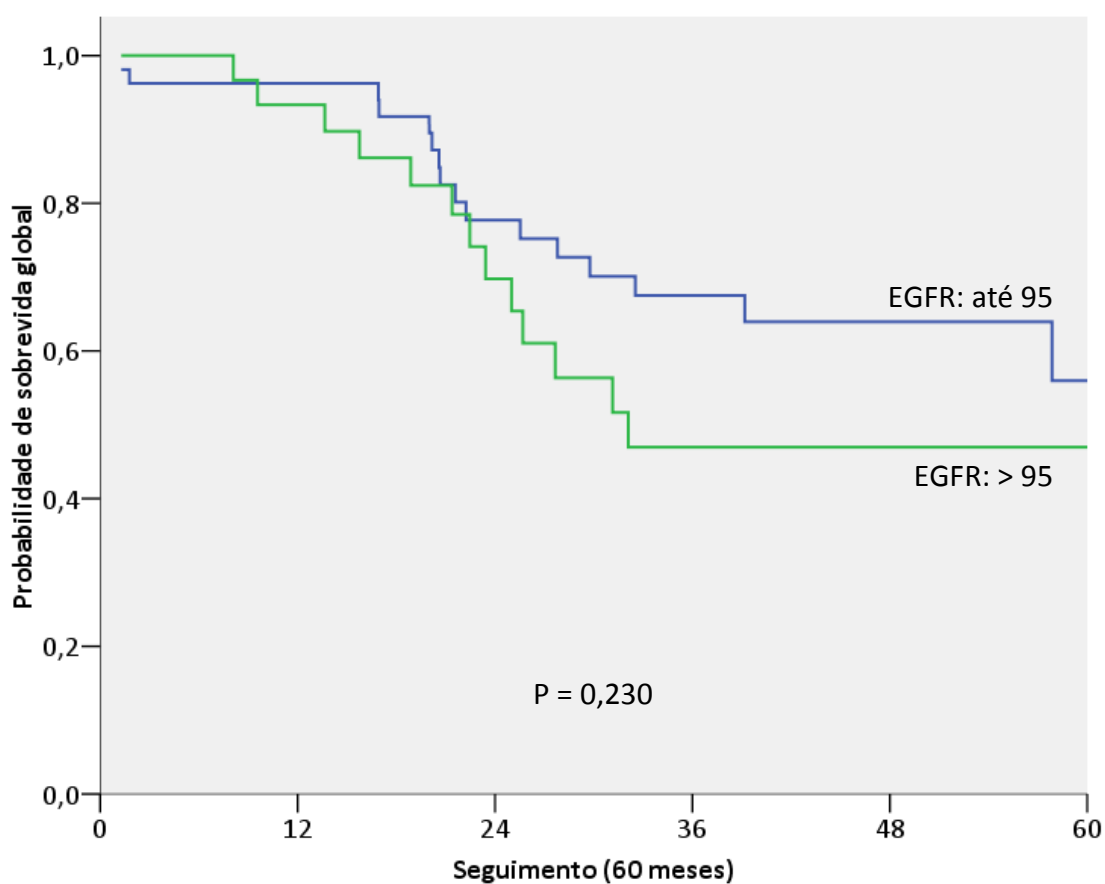


Figura 12 – Expressão do EGFR (ACIS) x Sobrevida Global

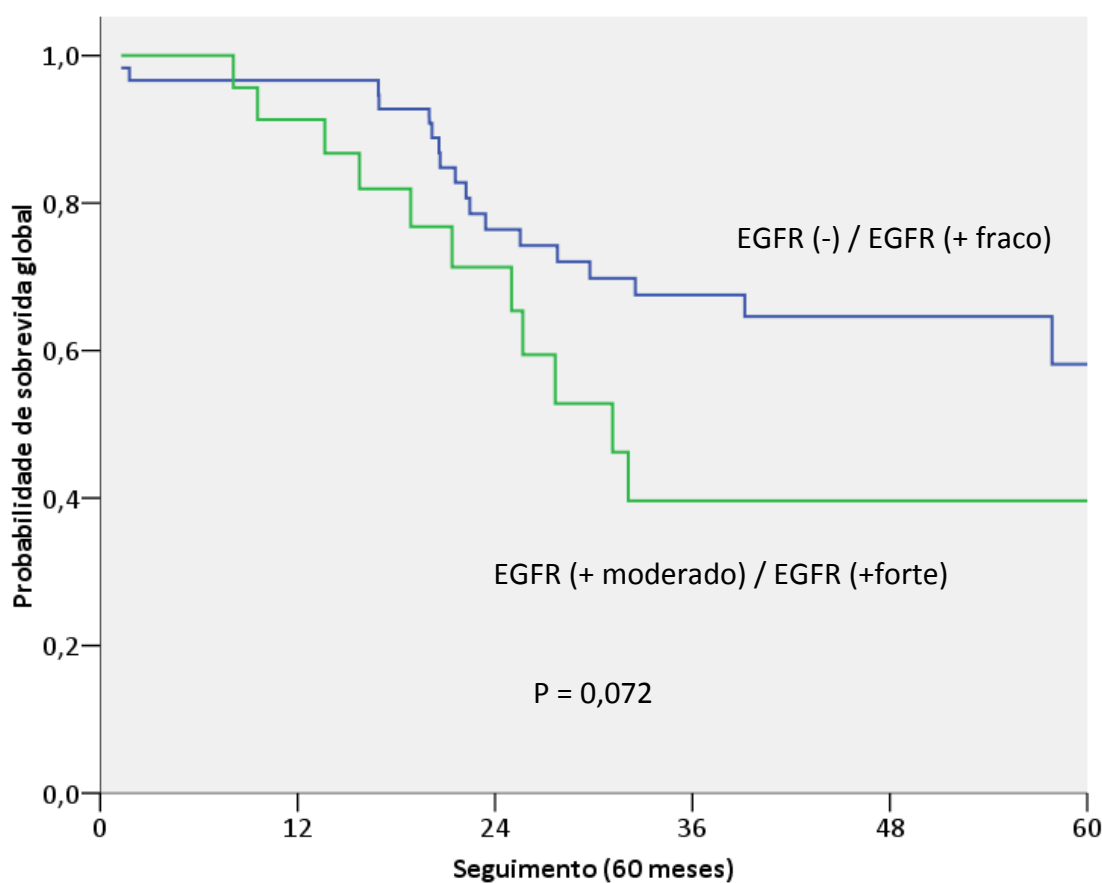


Figura 13 - Expressão do EGFR (não automatizado) x Sobrevida Global.

4.5 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO EGFR COM MÉTODOS IMUNOISTOQUÍMICOS DISTINTOS

Os métodos para a análise da expressão do EGFR foram o automatizado (ACIS) e o subjetivo (não automatizado). Houve correlação de moderada a forte intensidade, coeficiente de correlação de Spearman positivo de 0,751, e significância estatística ($P < 0,001$) entre os dois métodos (Figura 14).

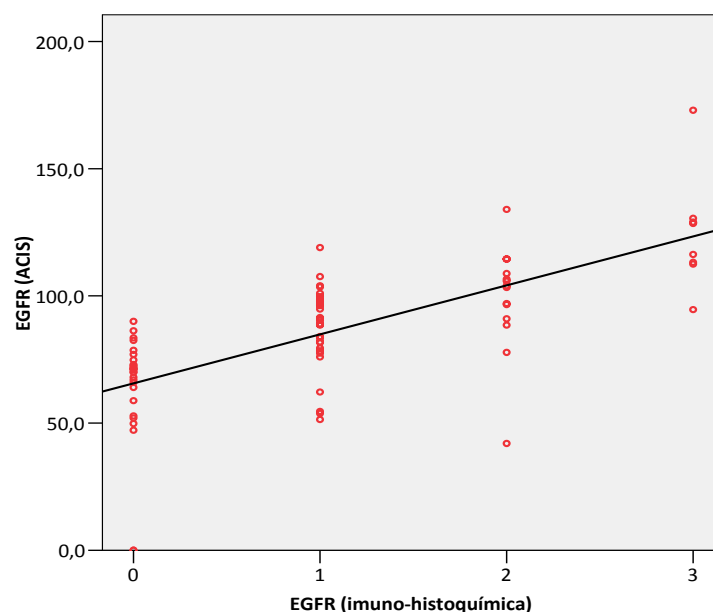


Figura 14 - Correlação entre a expressão do EGFR avaliada pelo ACIS e por imuno-histoquímica.

4.6 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO EGFR COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

Foi realizada avaliação estatística da correlação entre nível de expressão do EGFR com as seguintes variáveis: idade, sexo, grau histológico, localização do tumor primário, tamanho do tumor primário, linfonodos comprometidos, CEA pré-hepatectomia, metástase hepática sincrônica, tamanho da maior metástase hepática e quantidade de nódulos hepáticos metastáticos.

Na população estudada utilizando os dois métodos de análise, a expressão do EGFR não demonstrou associação com as outras variáveis clínicas e histopatológica (Tabela 10 e 11).

Tabela 10 - Avaliação dos valores medianos de expressão de EGFR obtidos pelo ACIS de acordo com diversas variáveis.

Variável	Categoria	n	EGFR (valor mediano)	Valor de P
Sexo	Feminino	39	90,0	MW: P=0,820
	Masculino	44	86,3	
Idade	Até 60 anos	49	91,0	MW: P=0,259
	> 60 anos	34	82,2	
Localização do tumor	Cólon	45	81,8	MW: P=0,141
	Reto	38	88,9	
Tamanho do tumor primário	T2	15	77,8	KW: P=0,440
	T3	52	89,5	
	T4	8	79,6	
Status linfonodal	N0	28	88,5	MW: P=0,613
	N1 – N2	48	87,6	
Grau histológico do tumor	Grau 1	9	90,0	MW: P=0,455
	Graus 2 e 3	57	88,5	
CEA pré- hepatectomia	Até 80	51	90,4	MW: P=0,861
	> 80	12	88,5	
Metástase sincrônica	Não	39	87	MW: P=0,134
	Sim	42	89	
Tamanho da maior metástase	Até 3 cm	36	83,9	MW: P=0,427
	> 3 cm	47	90,4	
Nº de nódulos metastáticos	Até 2	63	88,5	MW: P=0,651
	> 2	20	87,6	

Tabela 11 - Avaliação dos valores medianos de expressão de EGFR obtidos pela imunohistoquímica de acordo com diversas variáveis.

Variável	Categoria	Negativo - Fraco		Moderado - Forte		Valor de P *
		n	(%)	N	(%)	
Sexo	Feminino	27	(69,2%)	12	(30,8%)	0,810
	Masculino	32	(72,7%)	12	(27,3%)	
Idade	Até 60 anos	32	(65,3%)	17	(34,7%)	0,220
	> 60 anos	27	(79,4%)	7	(20,6%)	
CEA pré-hepatectomia	Até 80	38	(74,5%)	13	(25,5%)	0,159
	>80	6	(50%)	6	(50%)	
Localização do tumor	Cólon	36	(80,0%)	9	(20,0%)	0,057
	Reto	23	(60,5%)	15	(39,5%)	
Tamanho do tumor primário	T2	12	(80,0%)	3	(20,0%)	0,369
	T3-T4	40	(66,7%)	20	(33,3%)	
Status linfonodal	N0	22	(78,6%)	6	(21,4%)	0,301
	N1 – N2	31	(64,6%)	17	(35,4%)	
Grau histológico do tumor	Grau 1	6	(66,7%)	3	(33,3%)	1,000
	Graus 2 e 3	39	(68,4%)	18	(31,6%)	
Metástase sincrônica	Não	26	(66,7%)	13	(33,3%)	0,318
	Sim	33	(78,6%)	9	(21,4%)	
Tamanho da maior metástase	Até 3 cm	27	(75,0%)	9	(25,0%)	0,626
	> 3 cm	32	(68,1%)	15	(31,9%)	
Nº de nódulos metastáticos	Até 2	45	(71,4%)	18	(28,6%)	1,000
	> 2	14	(70,0%)	6	(30,0%)	

4.7 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS RESULTADOS DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS, PATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICAS EM RELAÇÃO AO PROGNÓSTICO

Na análise multivariada, o CEA < 80 ng/ml e doença unilobar, não alcançaram significância estatística. Entretanto, o número de lesões metastáticas, tamanho das metástases hepáticas e a expressão do VEGF foram os únicos fatores independentes associados à sobrevida dos pacientes estudados (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultado da análise multivariada. Fatores de risco para óbito de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox.

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	HR ajustada *	IC 95% (HR ajustada)	P
Tamanho da maior metástase	Até 3 cm	1,0	Referência	0,007
	> 3 cm	4,2	1,5 - 12,2	
Número de nódulos metastáticos	Até 2	1,0	Referência	0,002
	> 2	4,1	1,7 - 10,0	
Doença bilobar	Não	1	Referência	0,055
	Sim	2,4	0,98 - 5,80	
CEA	<80	1	Referência	0,154
	80 ou mais	1,9	0,78 – 4,68	
Expressão de VEGF (ACIS)	Até 90	1,0	Referência	0,004
	> 90	6,7	1,8 – 24,4	

5 DISCUSSÃO

Dependendo do estágio patológico do câncer colorretal e da evolução da doença, a metástase hepática pode ser encontrada em até 50% dos pacientes e em 30% dos casos é o único sítio de doença sistêmica (STEELE e RAVIKUMAR 1989; KEMENY et al. 2006). Sabe-se que o melhor tratamento para a metástase hepática é a ressecção cirúrgica com sobrevida em 5 anos de 24% a 58% (WEI et al. 2006; SIMMONDS et al. 2006; CUMMINGS et al. 2007; REES et al. 2008). Entretanto, apesar dos benefícios da cirurgia, apenas 10% a 20% dos pacientes portadores de metástases são candidatos cirúrgicos (VIBERT et al. 2005). Felizmente, houve melhora no manejo dos pacientes portadores de metástase hepática e nos dias atuais, aqueles pacientes que há alguns anos eram candidatos apenas a quimioterapia paliativa, tornaram-se elegíveis para cirurgias e se beneficiam com a ressecção hepática com melhores índices de sobrevida (VIBERT et al. 2005).

A sobrevida global do nosso estudo foi de 58% em 5 anos e este resultado é comparável com os melhores da literatura, como o de ABDALLA et al. (2004) que demonstraram sobrevida de 57%. Atualmente, observa-se aumento na sobrevida dos pacientes submetidos à ressecção de metástase hepática por câncer colorretal, especialmente pelos avanços no tratamento oncológico com novas drogas quimioterápicas, melhor seleção dos casos e avanços da técnica cirúrgica.

Nas últimas décadas, estudos identificaram fatores prognósticos relacionados às metástases hepáticas de câncer colorretal e a análise de algumas destas variáveis é utilizada como marcador de sobrevida. No nosso estudo, além de identificarmos

estas variáveis, abordamos o impacto da expressão imunoistoquímica do VEGF e do EGFR na metástase hepática do câncer colorretal da nossa população.

Na análise dos fatores demográficos, sexo e idade não estavam associados com o prognóstico.

Os níveis séricos de CEA pré-hepatectomia superiores a 80ng/ml, se correlacionaram com pior prognóstico na análise univariada, mas não na análise multivariada. HUITRIC et al. (1976) reportaram associação entre níveis séricos aumentados do CEA no câncer colorretal com grau histológico indiferenciado e WANG et al. (1994) observaram que o CEA sérico aumentado, antes do tratamento do tumor primário, foi fator prognóstico independente na sobrevida. Para o câncer colorretal, está bastante claro a associação entre CEA e sobrevida e na conferência de consenso realizada pelo *Colorectal Working Group*, em 1999, esse marcador foi considerado como fator prognóstico independente. Entretanto, em relação ao CEA pré-hepatectomia, estudos não o ratificaram como fator prognóstico. FONG et al. (1999) já tinham observado que o CEA > 200ng/ml estava associado a um prognóstico pior e maior chance de morte na análise univariada, mas na análise multivariada não alcançou significância estatística. SUGAWARA et al. (2001) encontraram resultados semelhantes.

As lesões metastáticas hepáticas maiores que 3 cm foram de forma independente associadas a um pior prognóstico neste estudo. Vários autores reportam um pior prognóstico quando analisam a incidência de recorrência e sobrevida em metástases hepáticas de tumores colorretais maiores que 5cm (NORDLINGER et al. 1996; FONG et al. 1999; IWATSUKI et al. 1999; SCHEELE et al. 2001) e observaram que o tamanho das metástases foi um fator preditor

independente de sobrevida global e livre de doença após a ressecção hepática. Sabe-se que quanto maior a metástase hepática maior a chance de invasão vascular e, portanto, pior o prognóstico. Por outro lado, no estudo de HAMADY et al. (2006), o tamanho da metástase hepática não alcançou significância estatística na análise multivariada. Na maioria dos estudos, o tamanho da metástase hepática é considerado fator prognóstico adverso após a ressecção hepática, porém a presença de grandes lesões não contra-indica abordagem cirúrgica desde que se ofereçam margens e ressecção sem evidência de neoplasia.

No nosso estudo, a presença de lesão metastática nos dois lobos hepáticos foi identificada como um fator prognóstico adverso apenas na análise univariada ($p < 0,02$). Na literatura, há resultados conflitantes entre doença metastática hepática bilateral e sobrevida. FONG et al. (1999) não identificaram a presença de tumor bilobar como fator prognóstico adverso, entretanto, GAYOWSKI et al. (1994) relataram que envolvimento bilobar estava associado com pior sobrevida. Ainda não está claro se o envolvimento bilobar é um preditor de pior prognóstico.

A presença de mais do que 2 lesões metastáticas hepáticas mostrou resultado com significância estatística na análise univariada e foi identificada também como um fator prognóstico independente na sobrevida global neste estudo. FONG et al. (1999) também observaram resultados semelhantes na presença de 2 ou mais lesões metastáticas hepáticas, que apresentavam pior prognóstico na análise multivariada. Em estudo recente, FIGUERAS et al. (2007) reportaram sobrevida de 30% em pacientes com 4 ou mais metástases e de 24% acima de 5 lesões. Portanto, mesmo sendo um fator de mau prognóstico, o número de metástases hepáticas não deve desencorajar a abordagem cirúrgica.

Na última década, a ressecção hepática por metástases colorretais era contra-indicada em pacientes com 4 ou mais metástases hepáticas, doença bilobar, grandes lesões metastáticas, ou doença extra-hepática. Apesar das variáveis estarem associadas a pior prognóstico, elas não contra-indicam o tratamento cirúrgico. Deve-se incentivar a ressecção hepática, pois é a única com potencial curativo e, além disso, considerar o tratamento do paciente com metástases hepáticas em instituições de oncologia que privilegiem abordagem multidisciplinar, pois muitos destes pacientes necessitam de tratamento quimioterápico adjuvante.

É imperativo identificar os pacientes com risco aumentado de recidiva da doença através de fatores prognósticos e, atualmente, além dos fatores prognósticos já estabelecidos, pesquisas sugerem que a expressão de VEGF e de EGFR na metástase hepática de câncer colorretal, pode sinalizar para um risco aumentado de recidiva e menor sobrevida, tornando-os tão importantes quanto às variáveis já identificadas. FOLKMAN (1971) considerou o crescimento tumoral angiogênese-dependente, sendo o principal mediador neste evento o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). CLASPER et al. (2008) demonstraram que a expressão do VEGF no câncer colorretal está presente em 50% dos casos e há mínima expressão ou ausência em cólon normal e adenomas, porém identificaram também aumento da expressão em linfonodos comprometidos e nas metástases à distância, ou seja, na evolução natural do tumor, a angiogênese é fundamental para o processo de invasão e metástase e neste cenário há expressão aumentada do VEGF no tumor. KONDO et al. (2000) observaram que o aumento da expressão do VEGF estava relacionado ao maior potencial da vascularização tumoral e de metástase. No estudo de KANG et al. (1997), com 163 pacientes, foi observado a expressão de VEGF em 49,1% dos

tumores primários e esta estava aumentada em pacientes portadores de metástases hepáticas. Vale ressaltar que estes autores não observaram metástase em pacientes com expressão negativa de VEGF no tumor primário. No estudo de KURAMOCHI et al. (2006), foi observada uma forte correlação entre a expressão do VEGF no tumor primário e na metástase hepática. No entanto, BERNEY et al. (1998) avaliaram a expressão do VEGF no tumor primário e na metástase hepática e observaram redução da expressão do VEGF na metástase em relação à expressão no primário. Além dos estudos demonstrando a expressão do VEGF no tumor colorretal muitos autores têm estudado a sua relação com o prognóstico. LEE et al. (2000) observaram que a sobrevida dos pacientes com expressão do VEGF no tumor primário é pior do que naqueles com ausência de expressão. Uma recente meta-análise, que incluiu 27 estudos, reportou aumento da expressão do VEGF no câncer colorretal e esta estava associado a piores taxas de sobrevida na análise univariada e o estudo também ressaltou que a expressão de VEGF foi um fator independente no prognóstico dos pacientes operados após análise multivariada (DES GUETZ et al. 2006).

Na literatura há alguns estudos que investigaram a expressão do VEGF no tumor primário e nos linfonodos comprometidos e sua relação com a sobrevida, porém poucos investigaram a expressão do VEGF na metástase hepática e seu impacto prognóstico. No nosso estudo, a expressão do VEGF no citoplasma das metástases hepáticas de câncer colorretal foi de 96,4%. Além disto, neste estudo a expressão do VEGF na metástase foi fator independente de pior prognóstico. NOIKE et al. (2008) observaram que a expressão do VEGF na metástase hepática se correlacionou com a sobrevida na análise univariada, mas não alcançou significância

estatística na multivariada. TAMURA et al. (2004) realizaram um estudo semelhante ao nosso e observaram que a expressão do VEGF na metástase pulmonar de câncer colorretal estava associada a pior prognóstico. Portanto, apesar de não haver na literatura muitos estudos que associem expressão do VEGF na metástase hepática e sobrevida, nosso resultado revela que esta correlação deverá ser considerada e investigada com mais casos e seguimento maior, além de encorajar outros pesquisadores a estudar esta relação.

O nosso estudo avaliou também a associação da expressão do VEGF com as diferentes variáveis: sexo, grau histológico, localização do tumor primário, tamanho do tumor primário, linfonodos comprometidos, CEA pré-hepatectomia, metástase hepática sincrônica, tamanho da maior metástase hepática e quantidade de nódulos hepáticos metastáticos. Nesta série, a expressão do VEGF não mostrou correlação estatisticamente significativa entre sua expressão e estas variáveis, porém foi observada uma correlação da expressão do VEGF com a idade. Na população estudada, a expressão do VEGF foi maior nos pacientes com idade maior que 60 anos e apresentou uma expressão mediana 69,6, já nos pacientes até 60 anos foi de 51,5, e tal diferença demonstrou-se estatisticamente significativa na análise univariada. A análise pelo coeficiente de Spearman foi concordante, observando-se uma correlação positiva e significativa entre as variáveis, porém de magnitude fraca.

Nos últimos anos também tem sido investigada a expressão do EGFR como um evento iniciador da cascata de sinalização intracelular levando à proliferação, sobrevivência, angiogênese e metastatização (KARI et al. 2003). Muitos estudos reportam aumento da expressão do EGFR no câncer colorretal e linfonodos metastáticos. Em relação ao tumor primário, a expressão do EGFR pode variar de

16% para o câncer colorretal em estágios iniciais a 97% nos avançados (SCARTOZZI et al. 2004; SPANO et al. 2005; BRALET et al. 2005). YASUI et al. (1988) descreveram a expressão do EGFR em 26,6% dos pacientes com estágios II e III de câncer colorretal. Além da investigação deste marcador molecular nos tumores primários, alguns autores também avaliaram a sua relação com metástases linfonodais. MCKAY et al. (2002) estudaram a expressão do EGFR em 249 tumores colorretais e nas metástases linfonodais. Foi observada expressão positiva em 72,7% nos tumores primários e em apenas 40,5% das metástases linfonodais. BRALET et al. (2007) observaram a expressão do EGFR em 95% dos tumores colorretais de 40 pacientes e em 88% dos linfonodos metastáticos de 23 pacientes. No estudo de DENG et al. (2009), a expressão do EGFR no tumor primário e nos linfonodos metastáticos foi de 18% e 24%, respectivamente.

Em relação à expressão na metástase hepática, BRALET et al. (2007) observaram expressão do EGFR em 79% das metástases hepáticas de câncer colorretal em 51 pacientes operados. ITALIANO et al. (2005) observaram expressão em 81,3%, num grupo de 79 pacientes. No nosso estudo, a expressão do EGFR na metástase hepática pelo método automatizado (ACIS) foi de 97,6% e com o método subjetivo (não automatizado) houve expressão em 67,5% nas metástases hepáticas, ou seja, no nosso estudo, independentemente do método imunoistoquímico, houve uma alta expressão do EGFR semelhante à maioria dos trabalhos realizados.

Alguns autores têm encontrado discordância entre a expressão do EGFR no tumor primário e sua metástase correspondente. SCARTOZZI et al. (2004), não observaram correlação entre a expressão do EGFR no tumor primário e nas metástases (hepática, pulmonar, óssea ou no sistema nervoso central). Neste estudo,

o EGFR foi avaliado em 99 pacientes e considerado positivo em 53% dos tumores colorretais (tumor primário). No entanto, nas metástases, não foi observada a expressão do EGFR. Além disso, foi encontrada expressão do EGFR em 15% das metástases hepáticas cujo primário não expressava o EGFR. Estas observações sugerem que as metástases são biologicamente diferentes do tumor de origem, possivelmente por mutações adicionais e desenvolvimento de comportamento molecular distinto ao longo do tempo. BRALET et al. (2007) observaram a perda da expressão do EGFR nas metástases linfonodais e hepáticas, quando comparadas com o primário, em 27% dos pacientes. Por outro lado, ITALIANO et al. (2005) encontraram discordância apenas em 6,3% dos casos.

BRALET et al. (2007) concluíram que a variabilidade da expressão pode ter diferentes explicações. Para a análise imunoistoquímica ser confiável e reprodutível, vários passos devem ser padronizados: os anticorpos anti-EGFR comercialmente utilizados apresentam diferentes sensibilidades e não são específicos contra a forma biologicamente ativa do receptor; a escolha da amostra tumoral para determinar o status da expressão do EGFR, na maioria das vezes emprega-se apenas um sítio do tecido neoplásico; o ponto de corte do valor para definir a positividade de expressão do EGFR não está claramente estabelecido, pois em alguns estudos é considerado positivo quando é detectado em mais de 1% de células neoplásicas, enquanto outros acima de 10%. Todas estas considerações podem conduzir a má interpretação do resultado. CHUNG e SALTZ (2005) também sugerem que esta discrepância aparente nos resultados seja possivelmente em virtude da falta de padronização dos métodos imunoistoquímicos, implicando em interpretações distintas. Em virtude destas considerações, é importante reportar que no nosso estudo, para a análise do

EGFR, foram utilizados dois métodos de mensuração, o habitual (subjetivo – não automatizado) e o automatizado (ACIS). Observou-se concordância entre os métodos, já que se obteve um coeficiente de correlação significativamente forte e positivo. Estes dados sugerem que os resultados dos dois métodos são comparáveis caso haja necessidade de escolha de um deles para a análise da expressão do EGFR. Além destas considerações a respeito de diferentes resultados sobre a expressão do EGFR, há possibilidade de modulação da expressão induzida por quimioterapia como foi reportado por DE PAS et al. (2004). Estes autores observaram que em pacientes portadores de câncer de pulmão não pequenas células com expressão negativa para EGFR nos linfonodos mediastinais antes do tratamento, alguns se tornaram EGFR positivo após quimioterapia neoadjuvante nos linfonodos mediastinais e no tumor primário ressecados, ou seja, muito possivelmente ao submeter os pacientes a esquemas quimioterápicos, podem ocorrer mudanças no comportamento biológico tumoral e mudanças de expressão dos marcadores moleculares.

Na última década, também tem sido investigada a relação da expressão do EGFR com o prognóstico de sobrevida em pacientes com câncer colorretal. Estudos do início da década e também recentes observaram correlação entre a expressão do EGFR em linfonodos metastáticos de pacientes operados por câncer colorretal e piora na sobrevida (GOLDSTEIN e ARMIN 2001; DENG et al. 2009). Além destes, outros autores evidenciaram pior sobrevida quando os tumores primários ou metastáticos do câncer colorretal expressavam EGFR (KHORANA et al. 2003; RESNICK et al. 2004; GALIZIA et al. 2006). No nosso estudo não foi identificada a associação entre expressão do EGFR nas metástases hepáticas com a sobrevida em

nenhum dos dois métodos imunoistoquímicos (ACIS e subjetivo). Outros autores já tinham observado resultado semelhante ao nosso (MCKAY et al. 2002; CUNNINGHAM et al. 2006). SPANO et al. (2005) avaliaram a expressão do EGFR no câncer colorretal de 150 pacientes operados, com uma média de seguimento de 40 meses e não houve piora na sobrevida dos pacientes que expressavam o EGFR. MCKAY et al. (2002) também não observaram correlação da expressão do EGFR no tumor primário e sobrevida.

Neste trabalho, ao compararmos a expressão do EGFR nas metástases com fatores clínicos e patológicos, não foi observada correlação com nenhuma das variáveis estudadas e na literatura não encontramos estudos que investigaram associação da expressão do EGFR nas metástases hepáticas com as variáveis citadas no nosso trabalho.

Desde a observação pioneira de FOLKMAN (1971), o crescimento tumoral é considerado angiogênese-dependente e o VEGF é o fator pró-angiogênico mais extensamente estudado. Na prática clínica oncológica, o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) figura como um alvo terapêutico no tratamento do CCR metastático através de sua inibição com anticorpos anti-VEGF e estudos de fase III mostram benefícios no tratamento com o emprego do anticorpo Bevacizumabe nos pacientes com doença sistêmica (HURWITZ et al. 2009). MENDELSON (1990) considerou que seria possível inibir a proliferação de células neoplásicas através do bloqueio da ativação do EGFR, nesta linha o cetuximabe, anticorpo inibidor do Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR), vem sendo investigado em estudos fase III em associação com drogas quimioterápicas como irinotecans no tratamento de primeira linha em pacientes

portadores de câncer colorretal metastático (VAN CUTSEM et al. 2009). Em um recente relato, WEIHRAUCH et al. (2008) publicaram um caso de um paciente que teve diagnosticado no ano de 2001 um adenocarcinoma de cólon estágio III. No ano de 2008, este apresentou metástase hepática irrissecável e linfonodos do hilo hepático aumentados. Após tratamento com cetuximabe, bevacizumabe capecitabina e oxaliplatina o paciente mostrou completa remissão tumoral. Este relato é intrigante e nos faz presumir que provavelmente este tumor expressava VEGF e EGFR para ter ocorrido resposta completa ao tratamento, mas infelizmente esta expressão não foi investigada antes do tratamento com os anticorpos monoclonais. JUBB et al. (2006) avaliaram a sobrevida nos pacientes portadores de metástases colorretais tratados com irinotecan, fluoracil e leucovorin associado à bevacizumabe e a expressão do VEGF, apesar de melhor sobrevida nos pacientes que expressavam o VEGF, esta diferença não alcançou significância estatística ($P=0,222$).

Sabemos hoje que as metástases hepáticas do CCR têm componente genético e que os inúmeros avanços no campo da biologia molecular muito têm contribuído para o melhor entendimento da história natural da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Ao identificar novos marcadores prognósticos têm-se a possibilidade de selecionar o grupo de pacientes com maior risco para a recidiva, progressão ou morte pela doença. Além disso, permite individualizar tratamentos mais específicos para os pacientes sob risco aumentado de recidiva. Portanto, a expressão do VEGF e do EGFR na metástase hepática poderá ser um marcador não só de pior prognóstico, mas também preditor de resposta a terapias com anticorpos monoclonais.

6 CONCLUSÕES

- 1 A expressão do VEGF nas metástases hepáticas colorretais foi fator prognóstico independente e associada a pior sobrevida.
- 2 A expressão do EGFR nas metástases hepáticas colorretais não foi identificada como fator prognóstico no estudo.
- 3 O tamanho e o número de metástases hepáticas foram fatores prognósticos independentes adversos para a sobrevida, assim como a expressão de VEGF.
- 4 Os resultados da análise pelos dois métodos imunoistoquímicos (ACIS e não automatizado) do EGFR nas metástases hepáticas tiveram correlação forte e são comparáveis, ou seja, caso haja necessidade, pode-se utilizar um deles para a análise da expressão do EGFR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. **Ann Surg** 2004; 239:818-25

Abe A, Fukui H, Fujii S, et al. Involvement of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in vascularization and lymph node metastasis of colorectal cancers with submucosal invasion. **J Gastroenterol Hepatol** 2007; 22:1071-7.

Adson MA, van Heerden JA, Adson MH, Wagner JS, Ilstrup DM. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. **Arch Surg** 1984; 119:647-51.

Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular Signalling: PDK1 - a kinase at the hub of things. **Curr Biol** 1999; 9:93-6.

Bengmark S, Hafstrom L. The natural history of primary and secondary malignant tumors of liver: the prognosis for patients with hepatic metastases from colonic and rectal carcinoma by laparotomy. **Cancer** 1969; 23:198-202.

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:401-10.

Berney CR, Yang JL, Fisher RJ, Russell PJ, Crowe PJ. Vascular endothelial growth factor expression is reduced in liver metastasis from colorectal cancer and correlates with urokinase-type plasminogen activator. **Anticancer Res** 1998; 18:973-7.

Bismuth H, Adam R. Reduction of nonresectable liver metastasis from colorectal cancer after oxaliplatin chemotherapy. **Semin Oncol** 1998; 25(2 Suppl 5):40-6.

Bockhorn M, Frilling A, Frühauf NR, et al. Survival of patients with synchronous and metachronous colorectal liver metastases-Is there a difference? **J Gastrointest Surg** 2008; 12:1399-405.

Boddy JL, Fox SB, Han C, et al. The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1a, HIF-2a and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7658-63.

Bralet MP, Paule B, Adam R, Guettier C. Loss of epidermal growth factor receptor expression in lymph node and liver metastases of colon carcinoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:5844.

Bralet MP, Paule B, Falissard B, Adam R, Guettier C. Immunohistochemical variability of epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver metastases from colonic carcinomas. **Histopathology** 2007; 50:210-6.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

Choti MA, Bulkley GB. Management of hepatic metastasis. **Liver Transpl Surg** 1999; 5:65-80.

Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF et al Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. **Ann Surg** 2002; 235:759-66.

Chung KY, Saltz LB. Antibody-based therapies for colorectal cancer. **Oncologist** 2005; 10:701-9.

Ciardiello F, Troiani T, Bianco R, et al. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy. **Ann Oncol** 2006; 17 Suppl 7:vii109-14.

Clasper S, Royston D, Baban D, et al. A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis. **Cancer Res** 2008; 68:7293-303.

Coffer PJ, Woodgett JR. Protein kinase B (c-AKT): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3 kinase activation. **Biochemistry** 1998; 335:1-13.

Cummings LC, Payes JD, Cooper GS. Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer: a population-based study. **Cancer** 2007; 109:718-26.

Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, et al. Coexpression of the IGF-IR, EGFR and HER-2 is common in colorectal cancer patients. **Int J Oncol** 2006; 28:329-35.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three AKTs. **Gene Dev** 1999; 13:2905-27.

Deng Y, Kurland BF, Wang J, et al. High epidermal growth factor receptor expression in metastatic colorectal cancer lymph nodes may be more prognostic of poor survival than in primary tumor. **Am J Clin Oncol** 2009; 32:245-52.

De Pas T, Pelosi G, de Braud F. Modulation of epidermal growth factor receptor status by chemotherapy in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer is rare. **J Clin Oncol** 2004; 22:4966-70.

Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer: meta-analysis of the literature. **Br J Cancer** 2006; 94:1823-32.

Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/AKT. **Curr Opin Cell Biol** 1998; 273:262-7.

Ekberg H, Tranberg KG, Andersson R, et al. Determinant of survival in liver resection for colorectal secondaries. **Br J Surg** 1986; 73:727-31.

Elias D, Cavalcanti A, Sabourin JC, et al. Resection of liver metastases from colorectal cancer: the real impact of surgical margin. **Eur J Surg Oncol** 1998; 24:174-9.

Elias D, Benizri E, Pocard M, Ducreux M, Boige V, Lasser P. Treatment of synchronous peritoneal carcinomatosis and liver metastases from colorectal cancer. **Eur J Surg Oncol** 2006; 32:632-6.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:795-803.

Figueras J, Torras J, Valls C, et al. Surgical resection of colorectal liver metastases in patients with expanded indications: a single-center experience with 501 patients. **Dis Colon Rectum** 2007; 50:478-88.

Finnegan TJ, Carey LA. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. **Future Oncol** 2007; 3:55-63.

Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxia regulation of lactate dehydrogenase: A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. **J Biol Chem** 1995; 270:21021-7.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med** 1971; 285:1182-6.

Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. **EXS** 1997; 79:1-8.

Fong Y, Kemeny N, Paty P, Blumgart LH, Cohen AM. Treatment of colorectal cancer: hepatic metastasis. **Semin Surg Oncol** 1996; 12:219-52.

Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart L. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. **Ann Surg** 1999; 230:309-18.

Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:823-35.

Gayowski TJ, Iwatsuki S, Madariaga JR, et al. Experience in hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of clinical and pathologic risk factors. **Surgery** 1994; 116:703-10.

Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. **Cancer** 2001; 92:1331-46.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. **Pharmacol Ther** 2004; 102:37-46.

Hamady ZZ, Cameron IC, Wyatt J, Toogood GJ, Lodge JP, Prasad RK. Resection margin in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis: a critical appraisal of the 1cm rule. **Eur J Surg Oncol** 2006; 32:557-63.

Hamady ZZ, Malik HZ, Finch R, et al. Hepatic resection for colorectal metastasis: impact of tumour size. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:1493-9.

Hanna W, Nofech-Mozes S, Kahn HJ. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer: a rare event. **Breast J** 2007; 13:122-9.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. **Nat Med** 1997; 3:177-82.

Hughes K, Rosenstein RB, Songhorabodi S, et al. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastasis: a multi-institutional study of long-term survivor. **Dis Col Rectum** 1988; 31:1-4.

Huitric E, Laumonier R, Burtin P, Von Kleist S, Chavonel G. An optical and ultrastructural study of the localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in normal and cancerous human rectocolonic mucosa. **Lab Invest** 1976; 34:97-107.

Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. **Oncologist** 2009; 14:22-8.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptor and cancer: complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Italiano A, Saint-Paul MC, Caroli-Bosc FX, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications. **Ann Oncol** 2005; 16:1503-7.

Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. **J Biol Chem** 1998; 273:23410-8.

Iwatsuki S, Dvorchik I, Madariaga JR et al. Hepatic resection for metastatic colorectal adenocarcinoma: a proposal of a prognostic scoring system. **J Am Coll Surg** 1999; 189:291-9.

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat Med** 2003; 9:685-93.

Jamison RL, Donohue JH, Nagorney DM, Rosen CB, Harmsen WS, Ilstrup DM. Hepatic resection for metastatic colorectal cancer results in cure for some patients. **Arch Surg** 1997; 132:505-10; discussion 511.

Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero AS. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:217-27.

Jarnagin WR, Fong Y, Ky A, et al. Liver resection for metastatic colorectal cancer: assessing the risk of occult irresectable disease. **J Am Coll Surg** 1999; 188:33-42.

Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. **Clin Cancer Res** 2001; 7:892-5.

Kang SM, Maeda K, Onoda N, et al. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. **Int J Cancer** 1997; 74:502-7.

Kari C, Chan TO, Rocha de Quadros M, Rodeck U. Targeting the epidermal growth factor receptor in cancer: apoptosis takes center stage. **Cancer Res** 2003; 63:1-5.

Kato T, Yasui K, Hirai T, Kanemitsu Y, et al. Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. **Dis Colon Rectum** 2003; 46(10 Suppl):S22-31.

Kemeny N. Management of liver metastases from colorectal cancer. **Oncology (Williston Park)** 2006; 20:1161–1176, 1179; discussion 11798-6.

Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. **Cancer** 2003; 97:960-8.

Kondo Y, Arii S, Mori A, Furutani M, Chiba T, Iamamura M. Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line. **Clin Cancer Res** 2000; 6:622-30.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kokudo N, Imamura H, Sugawara Y. Surgery for multiple hepatic colorectal metastases. **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 2004; 11:84-91.

Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K. Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:29-33.

Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. **Eur J Cancer** 2000; 36:748-53.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. **Cancer Res** 1974; 34:997-1004.

Lise M, Da Pian PP, Nitti D, Pilati PL. Colorectal metastases to the liver: present results and future strategies. **J Surg Oncol** 1991; 2:69-73.

Lupinacci R, Penna C, Nordlinger B. Hepatectomy for resectable colorectal cancer metastases-indicators of prognosis, definition of resectability, techniques and outcomes. **Surg Oncol Clin N Am** 2007; 493:506-16.

Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies as potential anti-cancer agents. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1990; 37:889-92.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. **Oncogene** 2000; 19:6550-65.

McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. **Eur J Cancer** 2002; 38:2258-64.

Ministério da Saúde. **Estimativa /2010 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

Nagorney DM. Hepatic resections for metastases from colorectal cancer. **Probl Gen Surg** 1987; 4:83-92.

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. National Cancer Institute Expert Panel. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:583-96.

Noike T, Miwa S, Soeda J, Kobayashi A, Miyagawa S. Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. **Hum Pathol** 2008; 39:201-8.

Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, et al. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver: a prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Française de Chirurgie. **Cancer** 1996; 77:1254-62.

Noura S, Sekimoto M, Yamamoto H, et al. Significance of liver resection for multiple hepatic metastases from colorectal cancer [Abstract]. **Gan To Kagaku Ryoho** 2001; 28:1550-3.

Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:11709-14.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:359-71.

Rees M, Tekkis PP, Welsh FK, O'Rourke T, John TG. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. **Ann Surg** 2008; 247:125-35.

Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. **Clin Cancer Res** 2004; 10:3069-75.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. **EMBO J** 1998; 17:3005-15.

Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Shibuya M. Sawano A, Takahashi T. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLC. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 238:487-91.

Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR targeted monoclonal antibodies. **J Clin Oncol** 2004; 22:4772-8.

Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Gall FP. Indicators of prognosis after hepatic resection for colorectal secondaries. **Surgery** 1991; 110:13-29.

Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Resection of colorectal liver metastases. **World J Surg** 1995; 19:59-71.

Scheele J, Altendorf-Hofmann A. Resection of colorectal liver metastases. **Langenbecks Arch Surg** 1999; 384:313-27.

Scheele J, Altendorf-Hofmann A, Grube T, Hohenberger W, Stangl R, Schmidt K. Resection of colorectal liver metastases. What prognostic factors determine patient selection? [abstract] **Chirurg**. 2001; 72:547-60.

Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. **Trends Mol Med** 2007; 13:527-34.

Shah SA, Haddad R, Al-Sukhni W, et al. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. **J Am Coll Surg** 2006; 202:468-75.

Sheiner PA, Brower ST. Treatment of metastatic cancer to the liver. **Semin Liver Dis** 1994; 14:169-77.

Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. **Cell Struct Funct** 2001; 26:25-35.

Shirabe K, Takenaka K, Gion T, et al. Analysis of prognostic risk factors in hepatic resection for metastatic colorectal carcinoma with special reference to the surgical margin. **Br J Surg** 1997; 84:1077-80.

Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. **Br J Cancer** 2006; 94:982-99.

Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. **Ann Oncol** 2005; 16:102-08.

Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestation. **South Med J** 1999; 84:575-8.

Steele G Jr, Ravikumar TS. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer: biologic perspectives. **Ann Surg** 1989; 210:127-38.

Sugawara Y, Yamamoto J, Yamasaki S, Shimada K, Kosuge T, Makuuchi M. Estimating the prognosis of hepatic resection in patients with metastatic liver tumors from colorectal cancer with special concern for the timing of hepatectomy. **Surgery** 2001; 129:408-13.

Tabernero J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. **Mol Cancer Res** 2007; 5:203-20.

Tamura M, Oda M, Tsunetzuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Watanabe G. Vascular endothelial growth factor expression in metastatic pulmonary tumor from colorectal carcinoma: utility as a prognostic factor. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2004; 128:517-22.

Thomas SM, Grandis JR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. **Cancer Treat Rev** 2004; 30:255-68.

Tranberg K, Bengmark S. Metastatic liver tumours of the liver. In: Blumgart LH, editor. **Surgery of the liver and the biliary tract**. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p.1371-97.

van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2009; 360:1408-17.

Vibert E, Canedo L, Adam R. Strategies to treat primarily unresectable colorectal liver metastases. **Semin Oncol** 2005; 32(6 suppl 8):33-9.

Vogt P, Raab R, Ringe B, Pichlmayr R. Resection of synchronous liver metastases from colorectal cancer. **World J Surg** 1991; 15:62.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem** 1994; 269:26988-95.

Wang JY, Tang R, Chiang JM. Value of carcinoembryonic antigen in the management of colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 1994; 37:272-7.

Wei AC, Greig PD, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:668-76.

Weihrauch MR, Stippel D, Fries JW, et al. Complete remission in a colon cancer patient with a large, irresectable liver metastasis after XELOX / cetuximab / bevacizumab treatment. **Onkologie** 2008; 31:464-7.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:18-43.

Woodington GF, Waugh JM. Results of resection of metastases tumors of the liver. **Am J Surg** 1963; 105:24-9.

Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas **Cancer Res** 1988; 48:137-41.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:127-37.

Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. **Nature** 1998; 396:584-7.