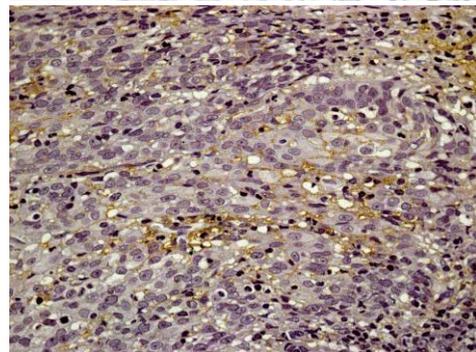
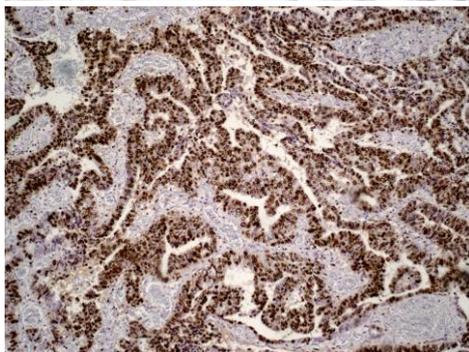
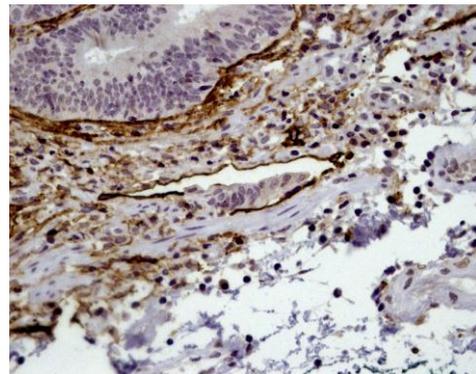
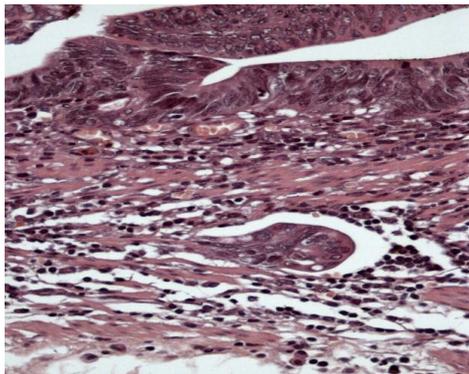


**NAYZE LUCENA SANGREMAN ALDEMAN**

**IMPACTO DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO NO ESTADIAMENTO  
DAS NEOPLASIAS PRECOSES DO TRATO GASTROINTESTINAL  
SUBMETIDAS À DISSECÇÃO ENDOSCÓPICA DA SUBMUCOSA (DES)**



**Belo Horizonte  
2012**

**NAYZE LUCENA SANGREMAN ALDEMAN**

**IMPACTO DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO NO ESTADIAMENTO  
DAS NEOPLASIAS PRECOSES DO TRATO GASTROINTESTINAL  
SUBMETIDAS À DISSECÇÃO ENDOSCÓPICA DA SUBMUCOSA (DES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina.

**Área de concentração:** Patologia Investigativa

**Orientadora:** Profa. Dra. Mônica Maria Demas  
Álvares Cabral

**Coorientador:** Prof. Dr. Vitor Nunes Arantes

**Belo Horizonte  
2012**

A357i Aldeman, Nayze Lucena Sangreman.  
Impacto do estudo imuno-histoquímico no estadiamento das neoplasias precoces do trato gastrointestinal submetidas à dissecação endoscópica da submucosa (DES) [manuscrito]. / Nayze Lucena Sangreman Aldeman. - - Belo Horizonte: 2012.

84f.: il.

Orientador: Mônica Maria Demas Álvares Cabral.

Área de concentração: Patologia Investigativa.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Dissecação. 2. Endoscopia do Sistema Digestório. 3. Doenças Sanguíneas e Linfáticas. 4. Imunoistoquímica. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Cabral, Mônica Maria Demas Álvares. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM : WI 141

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **REITOR**

Prof. Dr. Clelio Campolina Diniz

## **PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

## **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Francisco José Penna

## **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

## **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes

## **SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

## **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Prof. Dr. Geraldo Brasileiro Filho

Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Prof. Dr. Wagner Luiz Taffuri

Conrado de Oliveira Gamba (discente)

## *Um Meio ou uma Desculpa*

*"Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho, sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.*

*Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá que se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo.*

*Se quiser um casamento gratificante, terá que investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo. O sucesso é construído à noite! Durante o dia você faz o que todos fazem.*

*Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial.*

*Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.*

*Não se compare à maioria, pois, infelizmente ela não é modelo de sucesso. Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.*

*Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.*

*Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.*

*A realização de um sonho depende de dedicação, há muita gente que espera que o sonho se realize por mágica, mas toda mágica é ilusão, e a ilusão não tira ninguém de onde está, em verdade a ilusão é combustível dos perdedores pois...*

*Quem quer fazer alguma coisa, encontra um MEIO.*

*Quem não quer fazer nada, encontra uma DESCULPA."*

*Roberto Shinyashiki*

*Aos meus familiares queridos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, por estar viva e saudável para realizar os meus sonhos e poder compartilhá-los com os amigos.

Aos meus pais, Nildo Sangreman e Antonia Aldeman, pelo amor incondicional, por me oferecerem conforto e segurança nos momentos difíceis e principalmente por me ensinarem valores morais que levarei para toda a vida.

Ao meu esposo, Júnior, pelo amor e compreensão durante estes três anos de ausência. “Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha juntos é o começo da realidade.” *D. Quixote*

Aos meus familiares queridos, principalmente meus irmãos Nayara e Nildo Filho, por sempre acreditarem no meu sucesso.

A todos os professores do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, por me ensinarem a amar a minha profissão.

Ao Prof. Vitor Arantes, meu coorientador, pelo empenho para que este trabalho fosse possível.

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali, Coordenador do Laboratório de Patologia Comparada do ICB – UFMG, por sua generosidade, cedendo alguns dos anticorpos utilizados neste trabalho.

À Profa. Helenice Gobbi do Laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, pela amizade e apoio através da doação de alguns dos anticorpos utilizados neste trabalho e realização das realizações imuno-histoquímicas.

Ao amigo Renato Laboissière, pela ajuda na realização das reações imuno-histoquímicas.

Ao Prof. Stanley Araújo, pelo apoio e participação ativa durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Moisés Salgado, pela documentação fotográfica perfeita dos casos deste trabalho e pelo desprendimento em partilhar todo o seu conhecimento conosco.

Às Técnicas em Patologia: Maria de Lourdes Gomes Evangelista, Margaret Gomes e Luciana Daise da Silva, pelo apoio na realização da microtomia e colorações imuno-histoquímicas.

Às amigas, Sarah, Maria Carolina, Juliana e Eveline, pela amizade e por me ajudarem a suportar a distância da minha família.

Aos colegas da Residência Médica, pela ajuda constante durante estes três anos.

Aos colegas da pós-graduação, funcionários e amigos do Departamento de Anatomia Patológica por todo o aprendizado partilhado com vocês durante estes anos.

Aos alunos da graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, Daniel Moore e Luísa Castro, pela ajuda durante todo o trabalho.

A todos os amigos que contribuíram e torceram para que este trabalho fosse concluído.

À querida Profa. Mônica Demas, agradeço não apenas por sua decisiva presença e sua indispensável inspiração, mas também, e principalmente, por ter acreditado em mim e ter sempre uma palavra de conforto nos momentos mais árduos dessa caminhada, assim como uma mãe. Obrigada pelas incontáveis horas dedicadas a esta conquista, que significa para mim muito mais que um título.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas,  
eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*

## RESUMO

**Introdução:** Recentemente, tem sido proposto o estudo de fatores prognósticos em neoplasias precoces do trato gastrointestinal (TGI) submetidas a dissecação endoscópica da submucosa (DES) pesquisados por meio de estudos imuno-histoquímicos, tais como a invasão vascular sanguínea (CD 34) e linfática (D2-40), a superexpressão da proteína Her-2/neu e a mensuração da atividade proliferativa através da marcação imuno-histoquímica do Ki 67. **Objetivos:** Nosso objetivo foi determinar o papel do estudo imuno-histoquímico no estadiamento de espécimes de dissecação endoscópica da submucosa: analisando comparativamente a detecção de IVL e sanguínea (IVS), pela HE e pela imuno-histoquímica (IHQ) com marcação por D2-40 e CD34 em uma série de produtos de DES, índice de proliferação celular com marcação pelo Ki 67 e superexpressão da proteína Her-2/neu, e correlacioná-las com os demais fatores prognósticos. **Material e métodos:** foi realizado estudo IHQ em cortes seriados, utilizando os marcadores D2-40 (endotélio linfático) e CD34 (pan-endotelial) em 30 casos consecutivos de produtos de DES com diagnóstico histológico de carcinoma para avaliar a presença de IVL e IVS. Também foram utilizados os marcadores Ki 67 (proliferação celular) e Her-2/neu. Os resultados obtidos pela análise à IHQ foram comparados com a detecção de IVL e IVS pela HE, e correlacionados com outros fatores prognósticos, assim como o índice de proliferação celular e a superexpressão do Her-2/neu. **Resultados:** A detecção de IVL foi consideravelmente maior que a de IVS. A presença de IVL foi detectada em 6/30 casos (20%) pela HE e em 9/30 casos (30%) pela IHQ. Dos 6 casos com IVL ao HE, 3 eram falso-positivos à IHQ. A IHQ detectou IVL em 6 casos que haviam sido considerados negativos ao HE. A IVS foi evidenciada em 5/30 casos (16,7%) pela HE e pela IHQ em apenas 1 caso (3,3%). Foram identificados, pela análise à IHQ, 5 casos falso-positivos e 1 caso falso-negativo para IVS. A comparação entre a detecção de IVL e IVS por ambos os métodos não mostrou diferença significativa. A concordância diagnóstica entre os métodos foi fraca para IVL (Kappa=0,211) e pobre para IVS (Kappa=0,167). O fator clínico-patológico relacionado à presença de IVL foi a profundidade do tumor nas camadas m1 (p=0,031) e m3 (p=0,047). Em contrapartida, todas as variáveis analisadas não mostraram correlação com a presença de IVS. Quando analisamos o índice de proliferação celular detectado pelo exame IHQ (Ki 67), não identificamos relação estatisticamente significativa com as variáveis analisadas. Todos os casos mostraram-se negativos para a superexpressão da proteína Her-2/neu. **Conclusão:** Nossos resultados indicaram que a análise

histopatológica dos produtos de DES realizando exclusivamente a coloração de rotina HE, como usualmente ocorre, não permite a avaliação adequada da presença de IVS ou IVL. O presente estudo contribuiu para ampliar e refinar o protocolo estabelecido uma vez que propõe a inclusão de estudos imuno-histoquímicos para pesquisa de IVS e IVL (CD34 e D2-40), proliferação celular (Ki 67) e superexpressão da proteína Her-2/neu. Desta forma são fornecidas, todas as informações atualmente possíveis que possam ser extraídas do produto de DES aprimorando o estadiamento da neoplasia.

**Palavras-chave:** dissecação endoscópica da submucosa, Invasão vascular linfática, Invasão vascular sanguínea, Imuno-histoquímica, CD34, D2-40, Ki 67, Her-2/neu.

## ABSTRACT

**Introduction:** Recently, it has been proposed the study of prognostic factors in malignant neoplasms of the gastrointestinal tract (GIT) submitted to endoscopic submucosal dissection (ESD) investigated by immunohistochemical studies, such as lymphatic (D2-40) and blood vascular invasion (CD 34), overexpression of Her-2/neu protein and measurement of proliferative activity by immunohistochemical staining of Ki 67. **Objective:** Our objective was to determine the role of immunohistochemical study in the staging of specimens of endoscopic submucosal dissection: analysis comparing the detection of BVI and LVI, the HE and immunohistochemistry (IHC) with dialing D2-40 and CD34 in a series of DES products, with cell proliferation by Ki 67 labeling and Her-2/neu protein overexpression, and correlate them with other prognostic factors. **Material and Methods:** The study was performed IHC in serial sections, using markers D2-40 (lymphatic endothelium) and CD34 (pan-endothelial) in 30 consecutive cases of DES products with histological diagnosis of carcinoma to assess the presence of LVI and BVI. We also used markers Ki 67 (cell proliferation) and Her-2/neu. The results obtained by the analysis were compared with IHC detection of LVI and BVI by HE, and correlated with other prognostic factors, as well as the rate of cell proliferation and overexpression of Her-2/neu. **Results:** Detection of LVI was considerably higher than that of IVS. The presence of IVL was detected in 6/30 cases (20%) and by HE in 9/30 cases (30%) by IHC. Of the 6 cases with LVI HE, 3 were false positives at IHC. The LVI IHC detected 6 cases that were considered negative for HE. The BVI was observed in 5/30 cases (16.7%) by HE and IHC in only 1 case (3.3%). Were identified by analyzing the IHC, 5 false-positive and 1 false-negative for IVS. The comparison between the detection of LVI and BVI by both methods showed no significant difference. The diagnostic agreement between methods was weak for LVI (Kappa = 0.211) and poor for BVI (Kappa = 0.167). The clinicopathological factors related to the presence of LVI was the depth of tumor layers m1 (p = 0.031) and m3 (p = 0.047). In contrast, all other variables showed no correlation with the presence of IVS. When analyzing the rate of cell proliferation detected by immunohistochemical examination (Ki 67), we did not identify a statistically significant relationship with the variables analyzed. All cases proved negative for overexpression of Her-2/neu protein. **Conclusion:** Our results indicated that the histopathological analysis of DES products exclusively performing routine HE staining, as usually happens, does not allow the proper evaluation of the presence of LVI or BVI. This study helped to extend and refine the established

protocol as proposing the inclusion of immunohistochemical studies researching for BVI and LVI (CD34 and D2-40), cell proliferation (Ki 67) and Her-2/neu overexpression of the protein. This way is submitted, all information currently possible that could be extracted from the product DES improving the staging of the neoplasm.

**Keywords:** endoscopic submucosal dissection, vascular invasion, lymphatic invasion vascular blood, Immunohistochemistry, CD34, D2-40, Ki 67, Her-2/neu.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 Justificativa.....	20
1.2 Objetivos.....	25
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	26
2.1 Dissecção endoscópica da submucosa .....	26
2.1.1 Aspectos gerais .....	26
2.1.2 Relação entre a profundidade da infiltração tumoral na parede do TGI e incidência de metástases linfonodais .....	28
2.1.3 Critérios de cura .....	29
2.1.4 Complicações .....	30
2.2 Novos parâmetros prognósticos na avaliação de produtos de DES.....	30
2.2.1 Importância prognóstica da IVL e IVS.....	30
2.2.2 Métodos de avaliação de IVL e IVS.....	31
2.2.3 Perspectivas da aplicação do método IHQ na detecção de IVS e IVS.....	32
2.2.4 Expressão da podoplanina como fator prognóstico isolado no carcinoma de células escamosas do esôfago.....	33
2.2.5 Avaliação do índice de proliferação celular.....	34
2.2.6 Superexpressão da proteína Her-2/neu.....	36
2.2.6.1 Aspectos gerais.....	36
2.2.6.2 Testes diagnósticos para detectar a amplificação e superexpressão do Her-2/neu.....	37
2.2.6.3 Aplicação no Câncer gástrico.....	37
2.2.6.4 Aplicação no Câncer de Esôfago.....	39
2.2.6.5 Aplicação no Câncer de cólon.....	40
<b>3 MÉTODO</b> .....	42
3.1 Seleção dos casos .....	42
3.2 Estudo morfológico dos tumores primários .....	43
3.3 Estudo imuno-histoquímico .....	43
3.4 Avaliação de invasão vascular .....	45
3.4.1 Avaliação de invasão vascular pela coloração de HE .....	45

3.4.2 Avaliação de invasão vascular pela coloração de IHQ .....	45
3.5 Avaliação de índice de proliferação celular.....	46
3.6 Avaliação da superexpressão do Her-2/neu.....	46
3.7 Análise estatística .....	46
<b>4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 Características gerais da amostra .....	48
4.1.1 Características clínico-patológicas dos casos .....	48
4.1.2 Revisão histopatológica.....	49
4.2 Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea .....	50
4.2.1 Avaliação da invasão vascular sanguínea e linfática pelos métodos de coloração de rotina (HE) e imuno-histoquímico .....	50
4.2.2 Comparação da eficácia dos métodos de HE e IHQ na identificação de invasão vascular .....	51
4.2.3 Correlação entre variáveis clínico-patológicas e invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela IHQ .....	55
4.3 Avaliação do índice de proliferação celular.....	57
4.4 Avaliação da superexpressão da proteína Her2-neu.....	59
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Her-2 diagnóstico em câncer gástrico, diferenças do câncer de mama (RÜSCHOFF et al., 2010).	38
<b>Tabela 2</b>	– Her-2 - critérios de pontuação para o câncer gástrico (RÜSCHOFF, 2012)	39
<b>Tabela 3</b>	– Características clínico-patológicas da amostra.....	49
<b>Tabela 4</b>	– Avaliação da invasão vascular linfática (IVL) pelos métodos de HE e IHQ.....	51
<b>Tabela 5</b>	– Avaliação da invasão vascular sanguínea (IVS) pelos métodos de HE e IHQ.....	51
<b>Tabela 6</b>	– Comparação entre a concordância diagnóstica na detecção de IVL e IVS pela HE e IHQ.....	51
<b>Tabela 7</b>	– Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a presença de IVL detectada à IHQ.....	55
<b>Tabela 8</b>	– Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a presença de IVS detectada à IHQ.....	56
<b>Tabela 9</b>	– Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a média do índice de proliferação celular detectada à IHQ.....	58

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais prevalentes no mundo em ambos os sexos. Fonte: Globocan, 2008 (IARC) - <i>Section of Cancer Information</i> (28/10/2012)	20
<b>Figura 2 –</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: <i>Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil (INCA)</i> (28/10/2012)	21
<b>Figura 3 –</b>	Etapas da DES (ARANTES et al., 2012)	26
<b>Figura 4 –</b>	Níveis de profundidade de invasão na parede do esôfago. (REPICI et al., 2010)	27
<b>Figura 5 –</b>	Média de idade dos pacientes.....	48
<b>Figura 6 –</b>	Fotomicrografias de invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela HE e IHQ.....	50
<b>Figura 7 –</b>	Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular linfática (IVL) em 30 casos de DES.....	52
<b>Figura 8 –</b>	Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular sanguínea (IVS) em 30 casos de DES.....	53
<b>Figura 9 –</b>	Fotomicrografias de invasão vascular linfática detectada apenas pela IHQ e de falsa invasão vascular diagnosticada ao HE.....	54
<b>Figura 10 –</b>	Fotomicrografias do índice de proliferação celular, por meio da marcação pelo Ki 67.....	57
<b>Figura 11 –</b>	Fotomicrografias do Her-2/neu.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

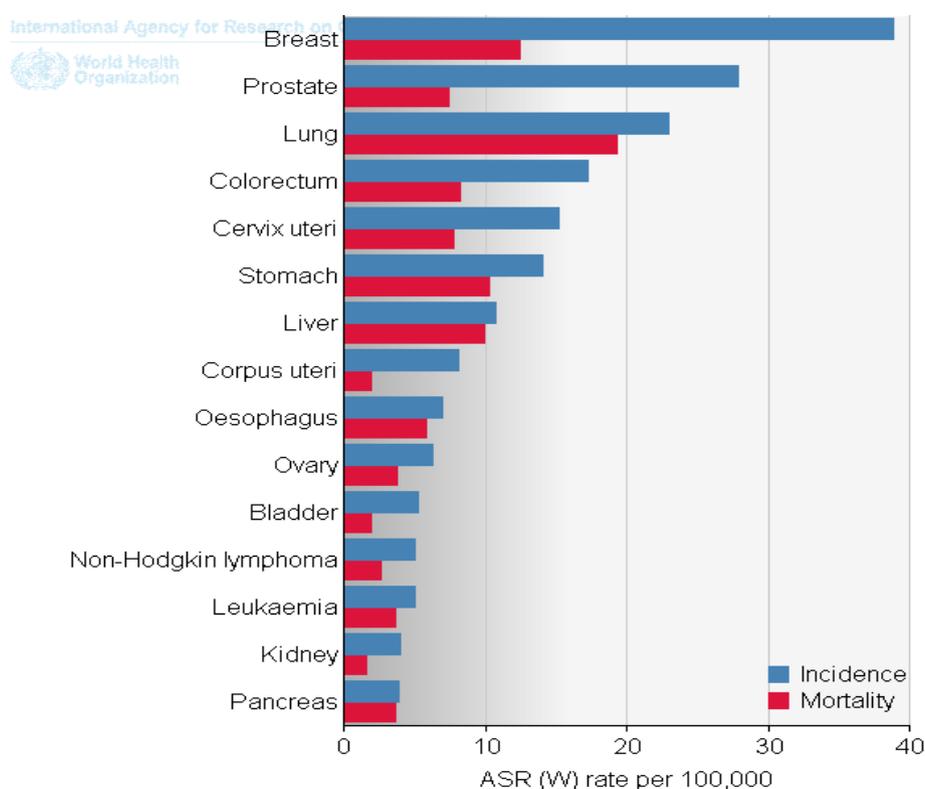
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APM	Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG
BVI	<i>Blood Vascular Invasion</i>
CG	Carcinoma gástrico
CCR	Carcinoma colorretal
CCE	Carcinoma de células escamosas
CE	Carcinoma esofágico
CISH	<i>Chromogenic in situ hybridization</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
DES	Dissecção endoscópica da submucosa
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> , ou Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGFR	Fator de crescimento epidérmico humano
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
GIT	<i>Gastrointestinal Tract</i>
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina e eosina
IAG	Instituto Alfa de Gastroenterologia
IHQ	Imuno-histoquímica ou imuno-histoquímico
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IVL	Invasão vascular linfática por células neoplásicas
IVS	Invasão vascular sanguínea por células neoplásicas
JGCA	<i>Japanese Gastric Cancer Association</i>
LVI	<i>Lymphatic Vascular Invasion</i>
µm	Micrômetros

M	Avaliação clínica de metástases hematogênicas segundo o TNM
N	Avaliação clínica de metástases linfonodais segundo o TNM
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão salino-fosfatado
SBP	Sociedade Brasileira de Patologia
T	Avaliação clínica da profundidade de invasão tumoral segundo o TNM
TGI	Trato Gastrointestinal
TNM	Sistema de classificação de neoplasias para estadiamento
ToGA	<i>Trastuzumab for GAstric cancer trial</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio vascular

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa

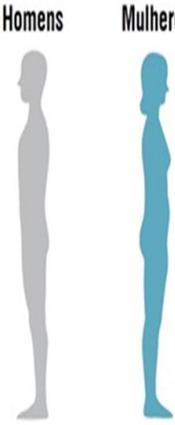
As neoplasias malignas do trato gastrointestinal (TGI) figuram entre as neoplasias viscerais mais prevalentes, exibindo altas taxas de morbidade e mortalidade. As estatísticas recentes revelam o seguinte panorama: o carcinoma gástrico (CG) é a quarta neoplasia mais frequente e a segunda maior causa de morte por câncer; o carcinoma colorretal (CCR) é o terceiro mais frequente e o quarto em mortalidade, enquanto o carcinoma do esôfago (CE) ocupa a oitava posição em incidência e a sexta em mortalidade, como podemos observar na figura 1 (WHO, 2008).



**Figura 1** – Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais prevalentes no mundo em ambos os sexos. Fonte: Globocan, 2008 (IARC) - *Section of Cancer Information* (28/10/2012)

Observa-se, contudo, que a incidência destas neoplasias tem exibido tendência ao declínio nos últimos decênios, notadamente nos países desenvolvidos. Tal fato é atribuído, dentre outros fatores, às medidas de rastreamento da população e aos novos métodos de abordagem propedêutica e terapêutica destas neoplasias em sua fase precoce (FUJISHIRO, 2008).

Estudos epidemiológicos mostram que essa tendência de melhoria é menos pronunciada no Brasil, onde atualmente ainda se registram altas taxas de incidência destas neoplasias. O CG é a quarta neoplasia mais frequente no sexo masculino e a sexta no feminino; o CCR é a terceira no sexo masculino e no sexo feminino; o CE é a sexta entre os homens e não figura entre as dez neoplasias mais incidentes entre as mulheres (Figura 2) (INCA, 2010).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tíreoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

**Figura 2** – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil (INCA) (28/10/2012)*

Ressalta-se ainda que, em países como o Brasil, as neoplasias gastrointestinais são frequentemente diagnosticadas em fases avançadas, requerendo abordagens terapêuticas mais agressivas e radicais como a ressecção cirúrgica do órgão e quimioterapia adjuvante (FUJISHIRO, 2008).

Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para o ano de 2012, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estão previstos 10.420 casos de CE, 20.090 de CG e 30.140 de CCR (INCA, 2010).

A endoscopia digestiva é o método de rastreamento mais eficaz para detecção de carcinomas do TGI e de suas lesões precursoras. Este método diagnóstico apresentou avanços notáveis nos últimos 20 anos, com o desenvolvimento da capacidade técnica dos endoscopistas em reconhecer as neoplasias em estágio precoce, fenômeno apoiado na constante incorporação de novas técnicas voltadas para a detecção e o manejo destes tumores (REPICI et al., 2010).

A ressecção endoscópica de neoplasias precoces do TGI tem sido cada vez mais aplicada, em casos selecionados, como alternativa aos procedimentos cirúrgicos mais invasivos, visando preservar o órgão e a qualidade de vida do paciente. Existem duas técnicas de ressecção endoscópica de neoplasia denominadas, respectivamente, ressecção endoscópica da mucosa (REM) e dissecação endoscópica da submucosa (DES), referidas respectivamente pelas siglas em inglês como EMR (Endoscopic Mucosal Resection) e ESD (Endoscopic Submucosal Dissection) (LI et al., 2007). A REM, também conhecida como mucosectomia, consiste na injeção submucosa de solução salina para elevação do tumor seguida de sua ressecção com alça de polipectomia, podendo ser auxiliada por outros acessórios tais como método de ligadura elástica ou de aspiração por *cap*. A desvantagem da REM é que quando a lesão-alvo é maior que 1 cm, torna-se difícil a remoção em bloco do tumor com margem de segurança, o que resulta na retirada de múltiplos fragmentos da lesão, técnica conhecida como mucosectomia a *piece-meal*. A técnica de DES foi desenvolvida no Japão há cerca de 10 anos com o objetivo de permitir a ressecção em monobloco de lesões neoplásicas de tamanho superior a 2 cm. As vantagens principais da DES são a produção de espécime em monobloco mais adequado para avaliação histológica, e do ponto de vista clínico a obtenção de ressecção local de maior potencial curativo, com maior margem de segurança o que resulta em menor taxa de recorrência (LI et al., 2007).

Entretanto, a ressecção endoscópica é um procedimento que, por sua natureza, não possibilita a retirada e tampouco a avaliação histopatológica de linfonodos locorregionais. Desta forma, o estadiamento linfonodal é realizado com métodos de imagem e caso sejam identificados linfonodos suspeitos de invasão neoplásica há contraindicação para execução do procedimento endoscópico (FUJISHIRO, 2008).

A classificação TNM do American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC) é a mais utilizada para o estadiamento dos pacientes com neoplasias de origem epitelial (SOBIN e WITTEKIND, 2002). Baseia-se na avaliação clínica e patológica da profundidade da invasão tumoral (T), da presença de metástases linfonodais (N) ou de metástases à distância (M) (AALTONEN et al., 2000). O prognóstico das neoplasias do TGI baseia-se, essencialmente, na profundidade da invasão tumoral e na presença de metástases linfonodais (PRENZEL et al., 2012).

No que diz respeito à profundidade da invasão tumoral, com base na classificação TNM de tumores malignos, os carcinomas T1 são subclassificados em T1a (invasão limitada à mucosa) e 1b (submucosa). Ademais, os carcinomas T1a são subdivididos em m1 (epitélio), m2 (lâmina própria) e m3 (muscular da mucosa). Os carcinomas submucosos T1b são subdivididos em Sm1 (invasão do terço superior da submucosa), Sm2 (invasão do terço médio) e Sm3 (invasão do terço inferior) (PRENZEL et al., 2012). Nas peças de ressecção endoscópica não é possível dividir os carcinomas T1b em Sm1, Sm2 e Sm3 visto que, frequentemente, nas peças somente um segmento da submucosa é amostrado. Portanto, a divisão Sm1 e Sm2 nestes espécimes obedece mensuração micrométrica da extensão da profundidade tumoral e o ponto de corte varia de acordo com o órgão estudado (CE - 200 $\mu$ , CG - 500 $\mu$ , CCR - 1000 $\mu$ ) (PRENZEL et al., 2012).

Quanto à presença de metástases linfonodais, estudos anteriores demonstraram que a presença de êmbolos neoplásicos vasculares, quer seja em vasos linfáticos (Invasão Vascular Linfática - IVL) ou sanguíneos (Invasão Vascular Sanguínea - IVS), é considerada fator preditivo positivo para a ocorrência de invasão neoplásica em linfonodos (PANTEL e BRAKENHOFF, 2004).

Portanto, para que se possa prescindir da linfadenectomia como usualmente ocorre nos casos submetidos à REM ou DES, é necessário excluir, com alguma segurança a presença de IVL ou IVS no tumor primário ao exame histopatológico (HYUNG et al., 2004; LI et al., 2007; LEE et al., 2010).

A presença de IVS e IVL pode ser avaliada diretamente nos cortes histológicos de tecidos pela coloração de rotina hematoxilina-eosina (HE) (WEIDNER et al., 1991; AMIOKA et al., 2002; HE et al., 2002; DING et al., 2006). Esta avaliação, porém, pode ser feita com maior precisão por meio da utilização de marcadores imuno-histoquímicos para o endotélio vascular de vasos sanguíneos e linfáticos (CD 34) e exclusivamente de vasos linfáticos (D2-40) (DU et al., 2003; PRADEEP et al., 2005).

A ressecção endoscópica de neoplasias precoces do TGI, quer seja na camada mucosa ou na submucosa, é um procedimento relativamente recente que requer infraestrutura e treinamento especializado do endoscopista. Esta técnica é executada em larga escala em países orientais, como o Japão, há mais de dois decênios. No ocidente, mesmo em países desenvolvidos, ainda são poucos os serviços de endoscopia aptos a realizar estes procedimentos, em particular a DES (PRADEEP et al., 2005).

Poucos estudos se propuseram a identificar fatores que possam predizer a ocorrência de metástases linfonodais em séries de tumores ressecados por DES. Como a realização de DES para ressecção de lesões precoces vem se tornando procedimento rotineiro para o tratamento das neoplasias precoces do TGI, é crucial realizar análise histopatológica minuciosa e acurada destes espécimens, a fim de determinar, com precisão, os fatores de risco para metástase linfonodal e outros fatores prognósticos (HA et al., 2007; CHOI et al., 2008; HUH et al., 2010; LEE et al., 2010).

Embora o sistema de estadiamento TNM seja essencial na definição do prognóstico e na avaliação do benefício da terapia adjuvante, tem se tornado cada vez mais necessária a utilização de outros recursos tais como biomarcadores para auxiliar na orientação do tratamento clínico dos pacientes pós-ressecção endoscópica da neoplasia (PRENZEL et al., 2012).

Recentemente, tem sido proposto o estudo de outros fatores prognósticos pesquisados por meio de estudos imuno-histoquímicos, tais como a superexpressão da proteína Her-2/neu (OCHS et al., 2004; PARK et al., 2006; PARK et al., 2007; KUWABARA et al., 2009) e a mensuração da atividade proliferativa por meio da marcação imuno-histoquímica do Ki 67 (JOO et al., 2006).

## 1.2 Objetivos

- Avaliar a IVS por células neoplásicas nos vasos sanguíneos em produtos de DES por meio da marcação, à IHQ, pelo CD34;
- Avaliar a IVL por células neoplásicas nos vasos linfáticos em produtos de DES por meio da marcação, à IHQ, pelo D2-40;
- Analisar comparativamente a detecção de IVL e IVS em produtos de DES pelos métodos de coloração de rotina (HE) e IHQ (CD34 e D2-40);
- Avaliar o índice de proliferação tumoral por meio da marcação a IHQ pelo Ki-67 em produtos de DES;
- Avaliar a superexpressão da proteína Her-2/neu por meio de imuno-histoquímica em produtos de DES;
- Correlacionar a presença de IVL, IVS, índice de proliferação tumoral e expressão do Her-2/neu com as características anatomopatológicas destas neoplasias precoces do TGI.

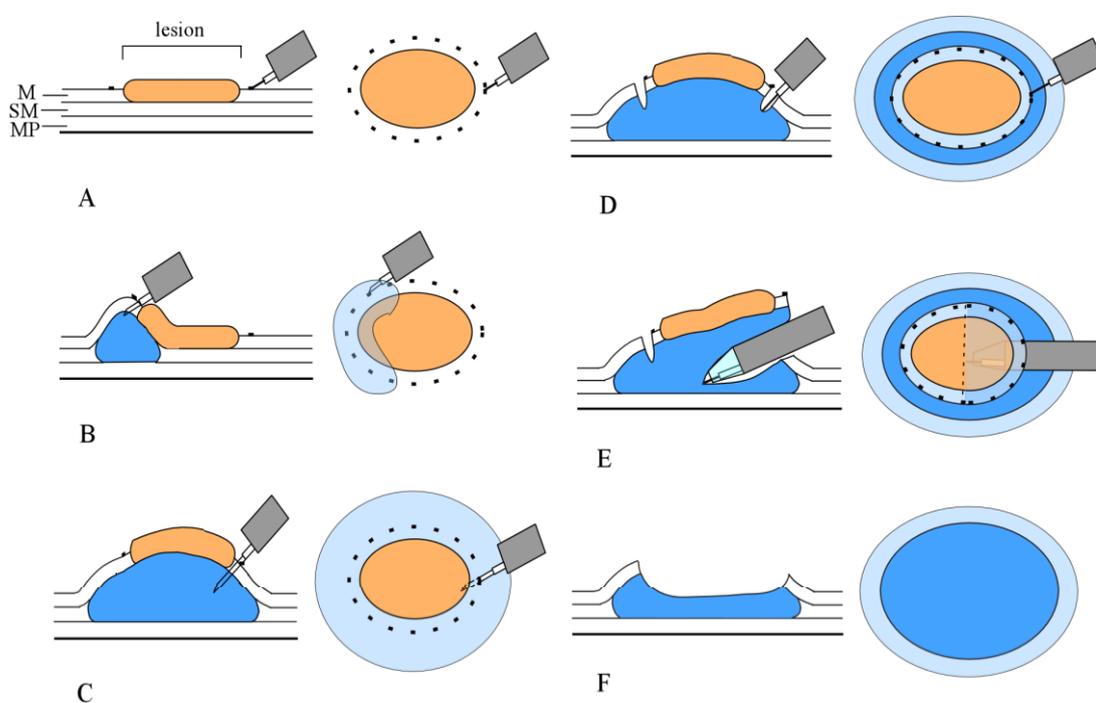
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Dissecção Endoscópica da Submucosa (DES)

#### 2.1.1 Aspectos gerais

A DES é uma nova técnica terapêutica endoluminal que envolve o uso de dispositivos de corte para permitir a maior ressecção do tecido acima da camada muscular própria (FUJISHIRO, 2008; ANG et al., 2010).

A técnica é realizada em quatro etapas: 1) delimitação das bordas da lesão observando-se margem de 2 a 5 mm; 2) injeção de fluido na camada submucosa para elevar a lesão a ser ressecada, destacando-a da camada muscular própria; 3) incisão da mucosa ao redor da lesão respeitando-se a margem demarcada e 4) dissecção do tecido conjuntivo da submucosa abaixo da lesão como observado na figura 3 (FUJISHIRO, 2008; ANG et al., 2010).

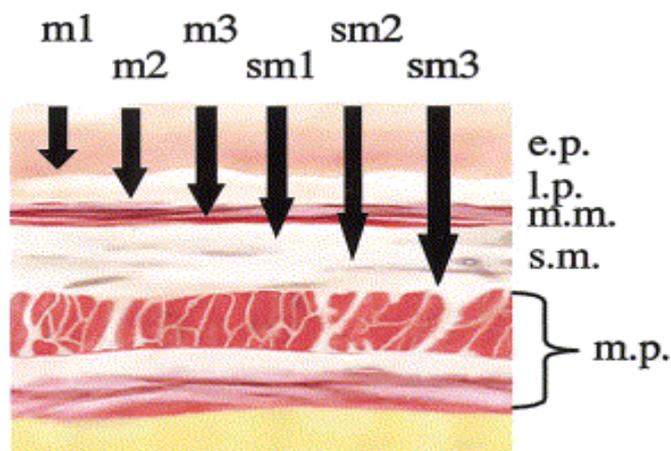


**Figura 3** – Etapas da DES (ARANTES et al., 2012).

As principais vantagens desta técnica, em comparação com a REM são: maior controle do tamanho e forma da ressecção, possibilidade de ressecção em bloco, mesmo para lesões maiores que 2 cm, e ressecção de lesões ulceradas ou com fibrose. Ademais, a DES possibilita a retirada de espécime de melhor qualidade para avaliação histopatológica e apresenta menores índices de recorrência local (HAMANAKA e GOTODA, 2005; FUJISHIRO, 2008).

A indicação para realização da DES, em cada caso, leva em consideração dois aspectos principais: as características da lesão a ser abordada e o risco de metástase linfonodal além, evidentemente, do preparo técnico do endoscopista para executar o procedimento. Como regra geral, a DES deve ser adotada naqueles tumores que tenham baixo risco de metástase linfonodal, ou seja nos tumores bem diferenciados restritos à camada mucosa (CE até M2, CG e CCR até M3). Naqueles casos em que existe microinfiltração focal da submucosa até 500 $\mu$  no CG e até 1000 $\mu$  no CCR o risco de metástase linfonodal ainda situa-se próximo a zero e a DES pode ser recomendada (FUJISHIRO, 2008).

A profundidade da invasão é subclassificada em três níveis (Figura 4): intra-epitelial (m1), até a lâmina própria (m2) e invasão da muscular da mucosa (m3). Nos pacientes nos quais a neoplasia invade a porção superficial da submucosa, a profundidade de invasão é definida como Sm1, sendo o limite máximo de invasão da submucosa que caracteriza Sm1 variável de acordo com o órgão (REPICI et al., 2010).



**Figura 4** – Níveis de profundidade de invasão na parede do esôfago. (REPICI et al., 2010)

A avaliação anátomo-patológica dos espécimes obtidos por DES compreende obrigatoriamente a análise dos seguintes itens: dimensões da lesão, tipo histológico e grau de diferenciação da neoplasia, profundidade da invasão, presença de êmbolos de células neoplásicas em vasos sanguíneos e linfáticos e o estado das margens de ressecção laterais e profunda (FUJISHIRO, 2008).

Esta avaliação quando feita de maneira completa possibilita o diagnóstico mais acurado e fornece bases para a definição do prognóstico e das medidas terapêuticas subsequentes (HAMANAKA e GOTODA, 2005).

No entanto, é essencial que a ressecção dos espécimes seja feita em monobloco uma vez que a ressecção fragmentada ou em *piece-meal* torna inviável a avaliação adequada de todos estes itens (FUJISHIRO, 2008).

A DES também pode ser indicada na abordagem de lesões recorrentes, considerando-se os riscos de complicações associadas, caso sejam observados todos os critérios previamente definidos para indicação deste procedimento (FUJISHIRO, 2008).

Os casos de neoplasias com alta probabilidade de ocorrência de metástases linfonodais, infiltração das camadas mais profundas da submucosa ou falha na tentativa de remoção completa por DES devem ser submetidos à avaliação para ressecção cirúrgica do órgão e das cadeias de linfonodos (FUJISHIRO, 2008; REPICI et al., 2010).

### **2.1.2 Relação entre a profundidade da infiltração tumoral na parede do TGI e incidência de metástases linfonodais**

As neoplasias malignas de origem epitelial ou carcinomas dos diferentes segmentos do TGI como esôfago, estômago, cólon e reto apresentam em geral comportamento biológico agressivo e, conseqüentemente, tendência à invasão vascular linfática e sanguínea e metástases para cadeias de linfonodos regionais e à distância (FUJISHIRO, 2008).

Contudo em neoplasias precoces, ou seja, restritas até a camada submucosa destes órgãos, o risco de metástases linfonodais tende a ser menor

com taxas de incidência variáveis de acordo com alguns fatores como: tamanho da lesão, medida da profundidade da invasão, grau de diferenciação tumoral, presença de embolização vascular e ulceração (FUJISHIRO, 2008; REPICI et al., 2010; PARK et al., 2011).

O carcinoma gástrico precoce, sem invasão vascular linfática, apresenta pouca probabilidade de metástases linfonodais nas seguintes apresentações: a) adenocarcinoma bem diferenciado intramucoso, sem ulceração; b) adenocarcinoma bem diferenciado intramucoso  $\leq 3$ cm, com úlcera; c) adenocarcinoma intramucoso indiferenciado  $\leq 2$ cm, sem úlcera; d) adenocarcinoma com mínima invasão da submucosa (sm1 ou  $500\mu\text{m}$  a partir da muscular da mucosa) e  $\leq 3$ cm (FUJISHIRO, 2008; ABE et al., 2012).

A incidência de metástases linfonodais para lesões confinadas à mucosa e submucosa do estômago pode variar, respectivamente, de 0% a 3% e 9 a 19% (CHAVES et al., 2010). O carcinoma de células escamosas do esôfago quando restrito à lâmina própria (m2) representa pouco risco de metástases linfonodais. A invasão da muscular da mucosa (m3) está associada a uma taxa de incidência de metástases linfonodais de 9,3% enquanto que na presença de invasão submucosa mínima (sm1 ou  $<200\mu\text{m}$  abaixo da muscular da mucosa) esta taxa aumenta para 19,6% (FUJISHIRO, 2008; REPICI et al., 2010).

O carcinoma colorretal intramucoso ou com invasão submucosa mínima (sm1 ou  $\leq 1000\mu\text{m}$ ), sem invasão vascular linfática, apresenta risco irrelevante de metástase linfonodal (0%) (FUJISHIRO, 2008; SAITO et al., 2010).

### **2.1.3 Critérios de cura**

A DES pode ser considerada curativa quando os seguintes critérios forem observados ao exame histopatológico do espécime: neoplasia epitelial bem ou moderadamente diferenciada; margens laterais e profunda livres da neoplasia e ausência de invasão vascular sanguínea e linfática. Estes critérios de avaliação servem como parâmetro para a previsão do risco de ocorrência de metástases linfonodais (ANG et al., 2010).

### **2.1.4 Complicações**

Dentre as complicações relacionadas à DES destacam-se a perfuração da parede do órgão durante o procedimento que, segundo relatos, pode ocorrer em torno de 4% dos casos e a ocorrência de hemorragia tardia com uma taxa de incidência de até 7% (HAMANAKA e GOTODA, 2005; ANG et al., 2010; ABE et al., 2012).

## **2.2 Novos parâmetros prognósticos na avaliação de produtos de DES**

### **2.2.1 Importância prognóstica da IVL e IVS**

As pesquisas atuais se concentram em revelar novos indicadores capazes de prever o comportamento biológico das neoplasias e o prognóstico dos pacientes ainda nas fases iniciais da doença.

Numerosos estudos relatam fatores de risco para metástases linfonodais nos carcinomas do trato gastrointestinal (MAEHARA et al., 1992; FOLLI et al., 2001; AN et al., 2007; KWEE e KWEE, 2008; MORITA et al., 2009).

A IVL é considerada um fator preditivo da ocorrência de metástases linfonodais em diversas neoplasias malignas, como o carcinoma mamário (TEZUKA et al., 2007), carcinomas de células renais (ISHIKAWA et al., 2007), adenocarcinoma colorretal (ISHII et al., 2009) e adenocarcinoma prostático (ROMA et al., 2006). A IVL ou IVS pelas células tumorais é um fator de risco para a disseminação neoplásica via rede linfática e sanguínea (PANTEL e BRAKENHOFF, 2004).

A presença de IVL detectada no tumor primário se correlaciona com a presença de metástases linfonodais e também é considerada fator prognóstico independente, segundo estudos de análise multivariada (TALAMONTI et al., 2003; NAKAMURA et al., 2006; SAKO et al., 2006).

A presença de IVL também indica evolução desfavorável mesmo nos pacientes livres de metástases linfonodais clinicamente evidentes (pN0) conforme

descrito em algumas neoplasias como nos carcinoma mamário e gástrico (ARNAOUT-ALKARAIN et al., 2007; LEE et al., 2007; ICHIKAWA et al., 2009).

A avaliação de IVL ou IVS no tumor primário ao exame histopatológico é um dos parâmetros morfológicos mais significativos para o planejamento de abordagens terapêuticas complementares, especialmente nos casos específicos de tumores precoce tratados por ressecção endoscópica (GOTODA et al., 2001; LI et al., 2008).

### **2.2.2 Métodos de avaliação de IVL e IVS**

A invasão vascular pelas células neoplásicas pode ser avaliada nas regiões peritumorais e intratumorais, utilizando-se coloração de rotina pela Hematoxilina e Eosina (HE) e método imuno-histoquímico (IHQ) com marcadores que apresentem especificidade para o endotélio sanguíneo e linfático.

A pesquisa de IVS e IVL tumoral na prática da patologia cirúrgica tem sido feita habitualmente por meio do exame microscópico de cortes histológicos da lesão tumoral corados pela coloração HE. Alguns estudos analisam a presença de IVS e IVL como fator prognóstico nos carcinomas do TGI utilizando apenas esta coloração (GOTODA et al., 2001; TALAMONTI et al., 2003; AN et al., 2007; LI et al., 2008; LIU et al., 2008; SHEN et al., 2009). Entretanto, a precisão das informações obtidas pelo método HE na pesquisa de IVS e IVL é limitada, devido às dificuldades inerentes à sua interpretação.

Geralmente, a IVL é identificada com base na histologia convencional com coloração pela HE, e o seu diagnóstico feito pela presença de êmbolo tumoral no interior de vasos revestidos por camada única de células endoteliais, sem conteúdo de hemácias (YONEMURA et al., 2006).

Os critérios disponíveis para o diagnóstico histológico de invasão angiolinfática na histologia convencional com coloração pelo HE incluem: presença de células tumorais dentro de um espaço vascular, hemácias vizinhas às células tumorais, identificação de células endoteliais revestindo o espaço, presença de lâmina elástica circundante ao tumor e fixação de células do tumor à parede vascular (HARRIS et al., 2008).

Entretanto, a obliteração completa do lúmen vascular por células neoplásicas pode não ser visível ao HE e não ser diagnosticada como IVL. Por outro lado, artefatos de retração devido à fixação do tecido, que circundam agregados de células tumorais, podem ser inadvertidamente considerados como IVL verdadeira. O diagnóstico de invasão vascular feito ao HE revela falta de especificidade em alguns aspectos, como na incapacidade de distinguir corretamente vasos linfáticos de vasos sanguíneos (SAKO et al., 2006; Van Den EYNDEN et al., 2006).

Estudos que abordam a variabilidade inter-observador na avaliação de IVL e IVS no CCR revelam baixa concordância entre os patologistas no diagnóstico de IVL e IVS quando se utiliza o método de coloração de rotina pela HE (HARRIS et al., 2008).

### **2.2.3 Perspectivas da aplicação do método IHQ na detecção de IVS e IVL**

Recentemente, registra-se na literatura grande progresso na aplicação dos estudos de IHQ na análise de IVS e IVL, com o surgimento de novos marcadores específicos para o endotélio linfático (JI, 2006).

A invasão linfática pelas células neoplásicas, avaliada apenas pela coloração de rotina, pode gerar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos (SAKO et al., 2006; YONEMURA et al., 2006).

O anticorpo monoclonal D2-40 foi reconhecido inicialmente como marcador de um gene oncofetal presente nas células germinativas fetais (MARKS et al., 1999). Esse marcador é capaz de detectar especificamente o endotélio dos vasos linfáticos (WANG et al., 2010; KAHN, MARKS, 2002). Ou seja, a detecção pela IHQ com D2-40 é positiva apenas nos vasos linfáticos, e negativa nos vasos sanguíneos (ARIGAMI et al., 2005). Essa especificidade permite utilizá-lo em estudos de invasão vascular em diversas neoplasias e distinguir IVL de IVS, com grande segurança (Van Den EYNDEN et al., 2006; MOHAMMED et al., 2007).

Entre os marcadores pan-endoteliais, o CD34 é amplamente utilizado em diferentes estudos de angiogênese, sendo considerado atualmente o melhor marcador vascular, quando comparado ao CD31 e ao Fator VIII (ELPEK et al.,

2000; TENDERENDA et al., 2001). No entanto, estudos para avaliar invasão vascular tumoral utilizando apenas o CD34, em detrimento a outros marcadores, têm produzido resultados inconsistentes e incompletos. A principal restrição à sua utilização como marcador isolado é o fato de não ser capaz de distinguir vasos sanguíneos de linfáticos (Van Den EYNDEN et al., 2006).

Quanto ao método de avaliação da invasão de vasos linfáticos e/ou sanguíneos, a maioria dos autores relata maior detecção de êmbolos neoplásicos quando o método IHQ foi utilizado (ARIGAMI et al., 2005; SAKO et al., 2006; HANAOKA et al., 2009; KIM et al., 2009; MORITA et al., 2009).

#### **2.2.4 Expressão da podoplanina(D2-40) como fator prognóstico isolado no carcinoma de células escamosas do esôfago**

Podoplanina, também denominada D2-40, é uma glicoproteína transmembrana pequena tipo mucina constituída de 162 aminoácidos, amplamente expressa em vários tipos de células especializadas em todo o corpo humano, como em podócitos glomerulares, osteoblastos e pneumócitos tipo 1 (TONG et al., 2012; LIN et al., 2010).

A expressão da podoplanina foi também observada em algumas neoplasias como mesoteliomas epitelioides, seminomas, hemangioblastomas, carcinomas papilíferos de tireoide e nos tumores com diferenciação linfática provável, incluindo sarcoma de Kaposi, linfangioma e angiossarcoma (LIN et al., 2010).

Algumas pesquisas apontaram a possível relação entre a expressão da podoplanina e nível de invasão do tumor ou o risco de metástase. No entanto, a função molecular exata e mecanismo de expressão da podoplanina em células neoplásicas permanece incerta, e a relação entre a expressão e o tempo de sobrevida do paciente ainda é controversa (TONG et al., 2012).

O comportamento biológico das células que superexpressam a podoplanina tende a ser mais invasivo, o que poderia indicar a possível relação entre a expressão da podoplanina e maior agressividade do tumor, ocorrência de metástases, maior probabilidade de invasão vasculo-linfática e menor resposta às drogas anti-neoplásicas (RAHADIANI et al., 2010).

A correlação entre a marcação da podoplanina e o prognóstico clínico é controversa e pode variar de acordo com o órgão estudado. A expressão da podoplanina aparentemente confere pior prognóstico para pacientes, especialmente com câncer na cavidade oral, enquanto que, no câncer de pulmão e da região cervical, verificou-se pior prognóstico quando havia baixa expressão desta glicoproteína (RAHADIANI et al., 2010).

### **2.2.5 Avaliação do índice de proliferação celular**

O Ki 67 é um antígeno nuclear presente nas células em proliferação e ausente em células quiescentes. Tem expressão em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 e G1 precoce, e é usado como marcador para indicar a atividade proliferativa dos tumores. Sua expressão é variável durante o ciclo celular e é aumentada em muitas neoplasias. Pode ser detectado em células de proliferação nos tecidos, tanto congeladas ou embebidas em parafina (JOO et al., 2006; LAZAR et al., 2010).

O índice de marcação de Ki 67 tem significado prognóstico em diferentes tipos de carcinomas. No câncer da mama, linfomas malignos e astrocitomas, uma alta taxa de proliferação celular expressa pelo antígeno Ki 67 tem significado prognóstico (SALMINEN et al., 2005).

No carcinoma de células escamosas do esôfago o Ki 67 é particularmente útil, também, para distinguir a neoplasia escamosa intraepitelial de baixo grau e alto grau. Tal diferenciação é importante devido a diferenças terapêuticas entre elas. A classificação de Vienna revista sugere ressecção endoscópica ou acompanhamento para as de baixo grau, e ressecção endoscópica ou cirúrgica para as de alto grau, ambas dependendo do tamanho total da lesão, idade do paciente e comorbidades associadas (WANG et al., 2011).

O epitélio gástrico de revestimento epitelial, foveolar e glandular está em constante processo de renovação celular que depende essencialmente do equilíbrio entre proliferação celular e apoptose. A manutenção deste equilíbrio, modulada por fatores promotores e inibidores, garante a integridade e homeostase da mucosa gástrica (CABRAL, 2006).

Alguns estudos têm mostrado que a neoplasia gástrica tipo intestinal apresenta índice de proliferação celular significativamente mais elevado. Outros, no entanto, não demonstraram a existência de correlação entre a proliferação de células neoplásicas e tipo histológico, de acordo com a classificação de Lauren (LAZAR et al., 2010).

Embora em vários estudos tenha sido observada correlação significativa entre a expressão de Ki 67 e profundidade de invasão do tumor, a maioria dos autores não demonstra relação entre o índice de proliferação celular e os fatores clínicos em câncer gástrico, como metástases linfonodais, invasão da serosa ou invasão vascular. No entanto, a IHQ para mensurar o índice de proliferação celular é útil para a identificação de um grupo de pacientes com tumores agressivos, com indicação de quimioterapia adjuvante pós-operatória (LAZAR et al., 2010).

No que diz respeito ao CCR foram relatadas observações contraditórias sobre o papel prognóstico do Ki67. Alguns estudos indicam que o aumento da expressão do antígeno de proliferação indica melhor sobrevida em câncer de reto e retosigmoide, devido sua alta sensibilidade à radioterapia (SALMINEN et al., 2005; GURZU et al., 2007). No entanto, a maioria dos estudos mostra que um alto índice de proliferação está associado com pior prognóstico nos CCR (HE et al., 2010).

Ao contrário do que é observado em muitos tumores, no CCR o grau histopatológico isolado não caracteriza prognóstico do tumor. Em tumores neste local, a apresentação de tumores de mesmo grau pode ser heterogênea quando medida pela proliferação (SALMINEN et al., 2005).

A influência da taxa de proliferação celular tumoral na sobrevida dos pacientes tem sido motivo de controvérsia podendo influenciar o curso clínico e o prognóstico do paciente (DUCHROW et al., 2003).

## **2.2.6 Superexpressão da proteína Her-2/neu**

### **2.2.6.1 Aspectos gerais**

A terapia molecular alvo no câncer do TGI tornou-se tema cada vez mais popular ao longo dos últimos anos. Em parte, isso é devido ao rápido avanço na capacidade de caracterizar a biologia do tumor. Outra consideração é a nossa incapacidade para prever a resposta de um tumor em particular para a terapia neoadjuvante (THOMPSON et al., 2011). Her-2 é o protótipo de um alvo terapêutico eficaz, sob a forma de um anticorpo monoclonal (trastuzumab) (YAN et al., 2010).

Her-2/neu é um proto-oncogene localizado no cromossoma 17q21 e um membro da família de receptor de fator de crescimento epidérmico humano (EGFR). Ele codifica uma proteína transmembrana de 185 kDa, que exhibe atividade tirosina quinase e, por meio de dimerização com outros membros da família, regula a transdução do sinal em processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (OCHS et al., 2004; PARK et al., 2006; PARK et al., 2007; KUWABARA et al., 2009; XIE et al., 2009; SHAH e CHEN, 2010; MOELANS et al., 2011).

Vários estudos indicam um papel do Her-2 no desenvolvimento de vários tipos de câncer humano. Her-2 é amplificado, e a expressão da sua proteína receptora é aumentada em cerca de 10%-20% dos carcinomas da mama (MOELANS et al., 2011).

A amplificação e superexpressão do Her-2/neu são utilizados como marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama e têm sido observadas também em carcinomas de cólon, bexiga, ovário, trompa de Falópio, endométrio, pulmão, colo uterino, cabeça e pescoço, próstata, pâncreas, glândula salivar, esôfago e estômago. Como marcador prognóstico, Her-2/neu é utilizado para prever o curso provável da doença. Como marcador preditivo, Her-2/neu é utilizado para prever a resposta terapêutica do paciente à quimioterapia e hormonioterapia adjuvantes e para selecionar pacientes para receber a imunoterapia com o anticorpo monoclonal anti-Her-2/neu (OCHS et al., 2004; PARK et al., 2006; PARK et al., 2007; MOELANS et al., 2011).

Trastuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado e recombinante criado contra Her-2 que inibe a proliferação do tumor relacionada a ele. Tem sido uma opção terapêutica eficaz em pacientes com câncer de mama Her-2 positivo, precoce e metastáticos, e de estômago avançados (HOFMANN et al., 2008; XIE et al., 2009).

#### **2.2.6.2 Testes diagnósticos para detectar a amplificação e superexpressão do Her-2/neu**

O status do Her-2 é principalmente avaliado por IHQ, hibridização in situ por cromógeno (CISH) ou hibridização in situ por fluorescência (FISH) (MOELANS et al., 2011).

Atualmente, o método mais comum para avaliar o status do Her-2/neu é por meio da IHQ, que é uma técnica de rotina disponível na maioria dos laboratórios de patologia para detectar os níveis de expressão de proteína. O sistema de pontuação é baseado na intensidade de reatividade, imunoreatividade da membrana completa ou incompleta e os percentuais de células reativas (HOFMANN et al., 2008; MOELANS et al., 2011).

#### **2.2.6.3 Aplicação no Câncer gástrico**

Os dados relatados na literatura para a positividade do Her-2/neu no CG variam de 7%-43%, com a maioria dos estudos demonstrando valores entre 15% e 25%. O *status* Her2-positivo em CG parece estar associado com pior prognóstico, doença mais agressiva, e menor sobrevida (RÜSCHOFF et al., 2010).

A primeira evidência sólida de que o status do Her-2 no CG pode ser utilizado para orientar a terapêutica veio com o relatório do “Trastuzumab for gastric cancer trial” (ToGA), que foi o primeiro estudo fase III, randomizado e controlado para avaliar os efeitos da terapia alvo anti- her2 no carcinoma gástrico avançado e adenocarcinoma de junção esôfago-gástrica HER2-positivo (HICKS e MILLER, 2011).

O método de escore do Her-2 dentro da fase experimental ToGA III baseou-se essencialmente em um estudo de validação separado (a chamada pré-ToGA), onde a expressão da proteína por IHQ e hibridação in situ por fluorescência (FISH), foi correlacionada em uma série de 168 espécimes de ressecção do câncer gástrico (BANG et al., 2010; RÜSCHOFF et al., 2010; MOELANS et al., 2011).

Em uma reunião de consenso internacional, modificações no sistema de pontuação, previamente desenvolvido para carcinoma de mama, foram feitas principalmente aceitando forte coloração incompleta membranosa (basolateral) como positiva (3 +) e abolindo a área de 10% de corte para este grupo em biópsias. A paciente foi considerada como tendo Her-2-positivo no CG com um escore de IHC 3 + e / ou FISH-positivo, como observado na tabela 1 (HOFMANN et al., 2008; RÜSCHOFF et al., 2010; MOELANS et al., 2011).

**Tabela 1** – Her-2 diagnóstico em câncer gástrico, diferenças do câncer de mama (RÜSCHOFF et al., 2010)

		Gastric cancer	Breast cancer
IHC scoring	Extent (Area Cut-off) Circularity	Biopsy specimens $\geq 5$ Cells Resection specimens: $\geq 10\%$ Mostly missing (often only lateral in IHC2+/3+)	$\geq 10\%$ ( $\geq 30\%$ ) <sup>a</sup>  A must in IHC2+/3+
(F)ISH analysis	Cell number  Amplification	20 cohesive tumor cells showing highest gene count (add 20 new if ratio 1.8–2.2)  Ratio $\geq 2.0$	20 cohesive tumor cells showing highest gene count (add 20 new if ratio 1.8–2.2)  Ratio $\geq 2.0$ ( $\geq 2.2$ ) <sup>a</sup>
HER2 positivity	Tumor type  Tumor location	About 30% of intestinal-type GC about 15% of mixed-type about 5% of diffuse type (signet ring type typically negative)  About 30% at cardiac/GE-junction about 15% of gastric cancer	15–25% of ductal type (G2/G3); almost never in subtypes such as lobular, medullar and ductal G1  No correlation
Patient selection	FISH vs. IHC	IHC more predictive than FISH: IHC primary test <sup>b</sup> FISH only if IHC2+	FISH/IHC equally predictive:

Como já mencionado, a heterogeneidade da superexpressão de Her-2 é um fenômeno frequente no CG. Portanto, biópsias gástricas, embora adequadas para o diagnóstico de carcinoma, não poderiam ser representativas de áreas superexpressas de Her-2. As diretrizes de pontuação propostas tentam

minimizar este problema diferenciando critérios de interpretação entre espécimes cirúrgicos e material de biópsia: um grupo de 5 células neoplásicas seria suficiente, quando 3 + de intensidade de coloração, para julgar um caso positivo na biópsia (ALBARELLO et al., 2011) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Her-2 - critérios de pontuação para o câncer gástrico (RÜSCHOFF, 2012)

<i>Score</i>	<i>Surgical specimen-staining pattern</i>	<i>Biopsy specimen-staining pattern</i>	<i>HER2 overexpression assessment</i>
0	No reactivity or membranous reactivity in <10% of tumor cells	No reactivity or no membranous reactivity in any tumor cell	Negative
1+	Faint/barely perceptible membranous reactivity in $\geq 10\%$ of tumor cells; cells are reactive only in part of their membrane	Tumor cell cluster with a faint/barely perceptible membranous reactivity irrespective of percentage of tumor cells stained	Negative
2+	Weak to moderate complete, basolateral, or lateral membranous reactivity in $\geq 10\%$ of tumor cells	Tumor cell cluster with a weak to moderate complete, basolateral, or lateral membranous reactivity irrespective of percentage of tumor cells stained	Equivocal
3+	Strong complete, basolateral, or lateral membranous reactivity in $\geq 10\%$ of tumor cells	Tumor cell cluster with a strong complete, basolateral, or lateral membranous reactivity irrespective of percentage of tumor cells stained	Positive

A superexpressão de Her-2/neu está correlacionada com comportamento biológico agressivo e de prognóstico reservado, apesar de alguns resultados contraditórios. No entanto, praticamente todos os estudos têm indicado que a superexpressão de Her-2 está fortemente associada com tumores bem diferenciados ou tipo intestinal de Lauren, que geralmente têm prognóstico melhor do que os tumores indiferenciados ou do tipo difuso de Lauren (KIM et al., 2011; YAN et al., 2011; MOELANS et al., 2011).

#### **2.2.6.4 Aplicação no Câncer de Esôfago**

Os dados sobre a superexpressão de Her-2 em CE são variáveis, com a maioria dos estudos mostrando a superexpressão em 9%-60% dos casos, enquanto que outros relatos falharam em observar essa expressão. As

diferenças entre as taxas de superexpressão relatadas podem depender do estágio da doença, tipo histológico (adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas), método e interpretação dos resultados de IHQ (MOELANS et al., 2010; WEI et al., 2007).

A superexpressão do Her-2 nos CE é avaliada usando o mesmo sistema de pontuação do CG (WEI et al., 2007).

Análises de subgrupos, de acordo com o tipo histológico, mostraram que a superexpressão e amplificação do Her-2 teve maior influência sobre o prognóstico em pacientes com CCE, quando comparado com adenocarcinoma. Tem sido sugerido que a sobrevida menor em pacientes positivos para Her-2 com CCE, pode ser devida ao aumento da resistência à terapia com radiação e quimioterapia baseada em cisplatina (CHAN et al., 2012).

A relação entre a expressão do Her-2 e prognóstico de pacientes com o câncer de esôfago não é clara. A superexpressão de Her-2 se correlaciona com a invasão tumoral e metástase linfonodal, e, assim, indicaria pior prognóstico (MOELANS et al., 2010).

O trastuzumab prolonga a sobrevida de pacientes com câncer da mama metastático positivos para superexpressão do Her-2. Da mesma forma, pacientes que apresentam positividade para a superexpressão do Her-2 em CCE do esôfago também poderiam ser beneficiados do uso do trastuzumab (KUWABARA et al., 2009). No entanto, devido à frequência da superexpressão de Her-2 no CE ser baixa e extremamente variável, e sua relação com o prognóstico não ser clara, o uso deste receptor como alvo para o tratamento do CE tem papel limitado (WEI et al., 2007, MOELANS et al., 2010).

#### **2.2.6.5 Aplicação no Câncer colorretal**

Os dados relatados na literaturam mostram positividade para Her-2 em CCR variando de 0% a 80%. Embora Her-2 tenha sido postulada como marcador de prognóstico biológico para o CCR, existem dados conflitantes sobre a prevalência da superexpressão, bem como sua relação com o prognóstico (PARK et al., 2007; LI et al., 2011).

DEMIRBAS et al. (2006) relataram associação entre a superexpressão do Her-2/neu e tamanho do tumor (>5 cm), grau de diferenciação e invasão vascular e linfática, sugerindo que a superexpressão da proteína desempenha papel importante na progressão do CCR e, sendo assim, considerada como indicador de prognóstico independente (LI et al., 2011).

Por outro lado, Jesus et al. (2005) relataram que a expressão do Her-2/neu não foi correlacionada com o sexo, a idade, a diferenciação do tumor, localização do tumor primário e sobrevida global, indicando que a expressão não desempenharia papel importante no tratamento terapêutico do CCR (LI et al., 2011).

Há várias razões possíveis para discrepâncias entre os estudos até o momento. O motivo mais provável para os resultados divergentes é a falta de consenso do sistema de pontuação utilizado para avaliar a superexpressão da proteína (LI et al., 2011).

Portanto, ainda não há, na literatura, consenso sobre o uso do trastuzumab em pacientes com CCR.

### **3. MÉTODO**

#### **3.1 Seleção dos casos**

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Protocolo No. 0310.0.203.000-11 (Anexo 1). Trata-se de estudo transversal de uma série de espécimes obtidos por DES de 30 pacientes com neoplasias do TGI, submetidos a este procedimento no Setor de Endoscopia do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas (HC) / UFMG.

A seleção dos casos foi realizada inicialmente a partir da análise retrospectiva de 18 laudos do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG), HC/UFMG no período de 2008 a 2010 e acrescida de 12 casos colhidos prospectivamente em 2011 e 2012.

A avaliação anatomopatológica foi feita de acordo com protocolo desenvolvido para este estudo com o objetivo de padronizar as análises macro e microscópicas de todos os espécimes obtidos por DES realizadas em pacientes com câncer precoce do TGI (Anexo 2).

Os espécimes de ressecção endoscópica foram estirados e fixados adequadamente com alfinete em placa de isopor pelo endoscopista assistente logo após o procedimento endoscópico. Todas as amostras retiradas das peças de DES para o estudo histopatológico, haviam sido fixadas em placa de isopor com alfinetes, imersa em frasco em formol P.A. a 10% e processadas no laboratório, estando incluídas em blocos de parafina. Durante a realização da macroscopia foi realizada a marcação da face cruenta do espécime com tinta nanquim, cortes seriados de 2mm de espessura e todo o material foi submetido a processamento histológico.

Os critérios para a inclusão no estudo foram:

- Dados clínicos e amostras representativas de tumor disponíveis em blocos de parafina no arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Alfa de Gastroenterologia, HC/UFMG
- Casos com lâminas e blocos de parafina disponíveis para reavaliação e em bom estado de conservação;
- Produtos de DES com resultado anatomopatológico de neoplasia maligna do TGI.

Os casos cujas amostras remanescentes nos blocos de parafina, arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do IAG do HC/UFMG, foram insuficientes para representação adequada das lesões neoplásicas nos estudos à IHQ com os marcadores propostos ou que não tinham representação de neoplasia maligna foram excluídos do estudo.

Os dados clínico-patológicos como gênero, idade dos pacientes ao diagnóstico e topografia do tumor foram obtidos a partir do banco de dados e da revisão dos laudos anatomopatológicos.

### **3.2 Estudos morfológicos dos tumores primários**

Foi realizada revisão histopatológica das lâminas coradas em HE, com amostras significativas da neoplasia provenientes dos blocos de parafina disponíveis. As características gerais do tumor primário analisadas foram: a classificação histológica do tumor segundo a OMS, o grau histológico de diferenciação, a classificação do tipo, margens laterais e profundas, IVS e IVL e a profundidade do tumor.

### **3.3 Estudo imuno-histoquímico**

A seleção dos blocos para estudo IHQ foi feita após a revisão histopatológica das lâminas coradas pelo HE dos casos em estudo. Com base nessa revisão, foram escolhidas aquelas lâminas representativas das áreas tumorais mais preservadas e com a maior concentração de vasos. A partir dos blocos de parafina correspondentes foram realizados cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura que foram colocados sobre lâminas silanizadas. Os cortes histológicos foram então desparafinizados e desidratados por tratamento em xilol e álcool.

Foram utilizados anticorpos monoclonais D2-40 (marcador específico do endotélio linfático), CD34 (marcador pan-endotelial), Ki 67 (marcador de proliferação celular) e Her-2/neu, detalhados no quadro 1.

**Quadro 1** – Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico.

ANTICORPO	CLONE	TIPO	DILUIÇÃO	REATIVAÇÃO ANTIGÊNICA	FABRICANTE
Ki-67	MIB1	Monoclonal	1:100	EDTA (ph=9)	Dako, US
D2-40	D2-40	Monoclonal	1:40	Citrato (ph=6)	Dako, US
CD34	QBEND/10	Monoclonal	1:20	EDTA (ph=9)	Biogenex, US
Her-2/neu	CB11	Monoclonal	1:200	-----	Novocasstra, UK

A técnica IHQ utilizada foi do polímero com amplificação de acordo com o método preconizado pelo Manual de Imuno-Histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) (ALVES et al., 1999).

Todas as lâminas foram submetidas ao pré-tratamento em solução tampão a 98°C em panela a vapor por 20 minutos, para recuperação antigênica, exceto as cujo anticorpo a ser pesquisado fosse o Her-2/neu. Foram realizados bloqueios da peroxidase endógena, por 15 minutos cada. Os anticorpos primários D2-40, CD34, Ki 67 e Her-2/neu foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente.

A revelação das lâminas foi feita pela diaminobenzidina (DAB). A coloração de fundo foi feita com hematoxilina de Harris. Controles negativos consistiram na substituição dos antissoros primários por imunoglobulinas de coelho ou cabra da mesma classe dos anticorpos primários.

### **3.4 Avaliação da invasão vascular**

Em cada caso, foi analisado todo o corte histológico buscando ativamente a identificação de IVL e IVS nas lâminas do tumor primário coradas em HE e pela IHQ. Essa avaliação foi realizada nas áreas intratumorais e peritumorais utilizando o aumento de 200x, com análise separada e depois simultânea por dois observadores em microscópio de dupla observação, sem conhecimento dos dados clínico-patológicos.

#### **3.4.1 Avaliação de invasão vascular pela coloração de HE**

A presença de IVS ou IVL foi considerada apenas quando um êmbolo de células neoplásicas era claramente visualizado no interior de um lúmen vascular revestido por endotélio evidente (Van Den EYNDEN et al., 2006).

Não foi considerada como invasão de vasos os ninhos de células neoplásicas com artefato de retração, sem endotélio circunjacente evidente. A IVS foi definida pela presença de êmbolos neoplásicos no lúmen vascular contendo hemácias, com ou sem músculo liso ao redor do endotélio. Para a definição de IVL, os êmbolos neoplásicos deveriam estar circundados por endotélio evidente, sem hemácias ou músculo liso.

#### **3.4.2 Avaliação de invasão vascular pela coloração de IHQ**

Em cada caso, foram examinadas as lâminas coradas pelos dois marcadores imuno-histoquímicos (CD34 e D2-40), para avaliação da presença de IVL e IVS.

A IVS foi definida pela presença de êmbolos neoplásicos e hemácias no lúmen vascular, com ou sem músculo liso ao redor do endotélio corado positivamente para CD34. A IVL foi identificada quando a marcação IHQ era negativa para D2-40 e positiva para CD34, aliada à presença de hemácias no lúmen vascular. Para a definição de IVL, os êmbolos neoplásicos deveriam ser circundados por endotélio corado positivamente pelo D2-40, sem hemácias ou músculo liso.

### **3.5 Avaliação de índice de proliferação celular**

Em cada caso foi analisado todo o corte histológico buscando ativamente a identificação da área tumoral com maior marcação pelo Ki 67 nas lâminas do tumor primário coradas pela IHQ. Após a identificação destas áreas a mensuração foi realizada utilizando o aumento de 400x, com análise simultânea por dois observadores em microscópio de dupla observação, sem conhecimento dos dados clínico-patológicos.

### **3.6 Avaliação da superexpressão do Her-2/neu**

Em cada caso foi analisado todo o corte histológico buscando ativamente a identificação da área tumoral com marcação pelo Her-2/neu nas lâminas do tumor primário coradas pela IHQ. Essa avaliação foi realizada nas áreas intratumorais utilizando os aumentos de 50x, 100x e 400x com análise simultânea por dois observadores em microscópio de dupla observação, sem conhecimento dos dados clínico-patológicos.

### **3.7 Análise estatística**

O banco de dados do estudo e todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS Statistics 17.0 (SPSS, Inc, Chicago, III). O valor de p considerado estatisticamente significativo foi de  $<0,05$ .

O coeficiente de Kappa de Cohen foi utilizado para verificar se a concordância entre os diferentes métodos de avaliação de invasão vascular (IHQ e HE) foi puramente aleatória (LANDIS e KOCH, 1977). O Quadro 2 revela os valores do coeficiente de Kappa de acordo com a classificação de Landis & Koch. Para analisar a associação entre as variáveis categóricas (como a presença de IVS ou IVL, profundidade do tumor), o teste Qui-quadrado foi aplicado.

**Quadro 2** – Resultados dos coeficientes de concordância de Kappa de acordo com a classificação de Landis & Koch. FONTE: Landis e Koch (1977).

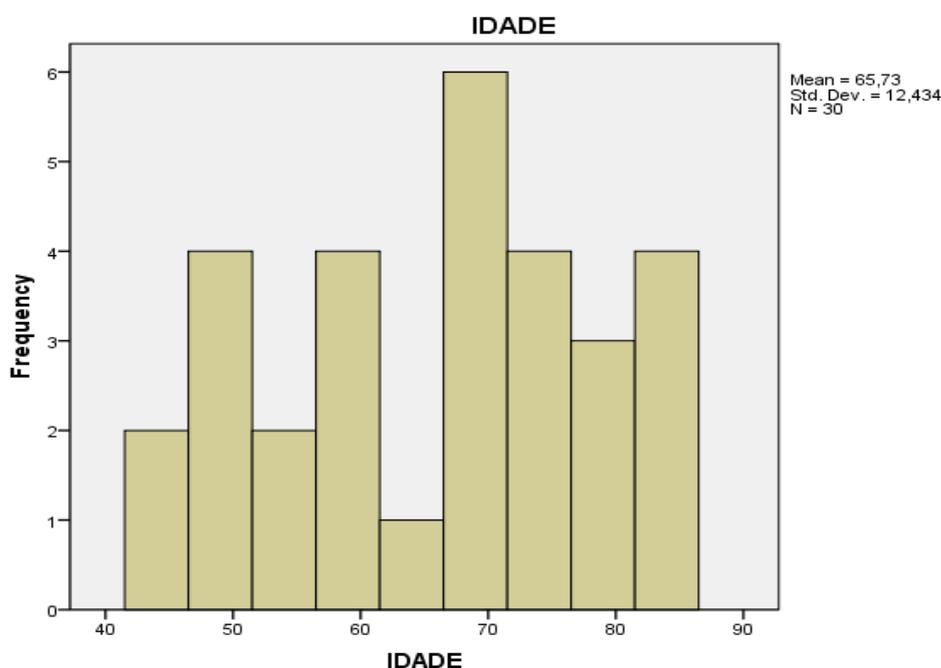
<b>Valor do coeficiente de Kappa</b>	<b>Classificação da concordância segundo Landis &amp; Koch</b>
< 0,20	Pobre
0,21 a 0,40	Fraca
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Boa
> 0,80	Muito boa

## 4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 4.1 Características gerais da amostra

#### 4.1.1 Características clínico-patológicas dos casos

Todos os pacientes (30) foram submetidos à DES. A idade dos pacientes, por ocasião do procedimento, variou entre 44 e 84 anos, sendo a média de 65,73 anos e o desvio-padrão 12,43. A mediana foi igual a 67,5 anos (Figura 5).



**Figura 5** – Média de idade dos pacientes.

Dezenove pacientes (63,3%) eram do sexo masculino e onze do sexo feminino (36,7 %). Todos os tumores eram precoces, a maioria intramucosos (25 casos). A maioria dos tumores estava localizada na região do esôfago (18 casos, 60,0%).

#### 4.1.2 Revisão histopatológica

A revisão histopatológica dos 30 casos em estudo mostrou a seguinte distribuição segundo a classificação da OMS: 16 casos de carcinoma de células escamosas (53,3%), 13 adenocarcinomas (43,3%) e 1 carcinoma de células em anel de sinete (3,3%).

Em relação à profundidade de invasão na parede do órgão 8 casos (26,7%) atingiam a camada mucosa ao nível m1(intra-epitelial), 8 (26,7%) m2 (lâmina própria), 9 (30%) a muscular da mucosa (m3), 4 (13,3%) alcançavam a camada submucosa em seu terço superior (sm1) e 1 (3,3%) em seu terço médio (Sm2).

Quanto ao grau de diferenciação, 5 casos (16,7%) eram bem diferenciados, 25 (83,3%) moderadamente diferenciados e nenhum foi classificado como pouco diferenciado. As características clínico-patológicas da amostra estão representadas na tabela 3.

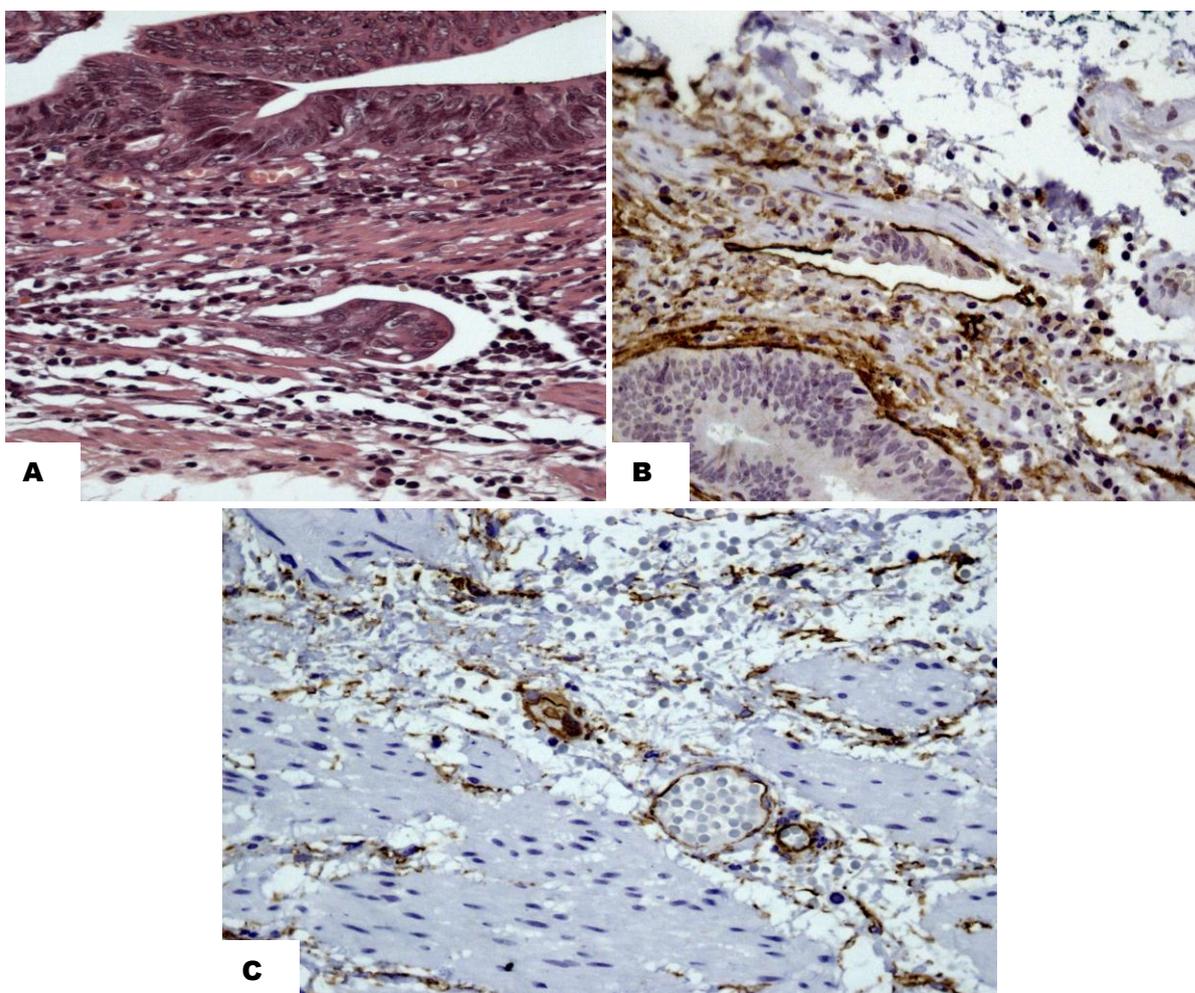
**Tabela 3 – Características clínico-patológicas da amostra**

<b>Dados clínicos-patológicos</b>	<b>N= 30 (100%)</b>
<b>Gênero</b>	
Masculino	19 (63,3)
Feminino	11 (36,7)
<b>Topografia</b>	
Esôfago	18 (60)
Estômago	8 (26,7)
Reto	2 (6,7)
Colón	2 (6,7)
<b>Tipo histológico da OMS</b>	
Carcinoma de células escamosas	16 (53,3)
Adenocarcinoma	13 (43,3)
Carcinoma de células em anel de sinete	1 (3,3)
<b>Profundidade de invasão</b>	
M1	8 (26,7)
M2	8 (26,7)
M3	9 (30,0)
Sm1	4 (13,3)
Sm2	1 (3,3)
<b>Grau de diferenciação</b>	
Bem diferenciados	5 (16,7)
Moderadamente diferenciados	25 (83,3)
Pouco diferenciados	0 (0)

## 4.2 Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea

### 4.2.1 Avaliação da invasão vascular sanguínea e linfática pelos métodos de coloração de rotina (HE) e imuno-histoquímico

O endotélio dos vasos linfáticos foi delineado em marrom pelo marcador D2-40 à coloração IHQ. A IVL foi claramente demonstrada à IHQ, em comparação com a coloração por HE. O marcador CD34 foi positivo no endotélio de vasos sanguíneos e linfáticos, colorindo o contorno dos vasos em marrom. A IVS foi identificada quando a marcação IHQ era negativa para D2-40 e positiva para CD34, aliada à presença de hemácias no lúmen vascular (Figura 6).



**Figura 6** – Fotomicrografias de invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela HE (seta) e IHQ. **A:** IVL HE (x400). **B:** IVL Marcação por D2-40 (x400). **C:** IVS Marcação por CD34 (x400).

A detecção de IVL foi consideravelmente maior que a de IVS. A presença de IVL foi detectada em 6/30 casos (20%) pela HE e em 9/30 casos (30%) pela IHQ (Tabela 4). A IVS foi evidenciada em 5/30 casos (16,7%) pela HE e pela IHQ em apenas 1 caso (3,3%) (Tabela 5).

**Tabela 4 – Avaliação da invasão vascular linfática (IVL) pelos métodos de HE e IHQ**

		IVL – HE		Total
		Negativo	Positivo	
IVL - IHQ	Negativo	18,0	3,0	21,0
	Positivo	6,0	3,0	9,0
Total		24,0	6,0	30,0

**Tabela 5 – Avaliação da invasão vascular sanguínea (IVS) pelos métodos de HE e IHQ.**

		IVS – HE		Total
		Negativo	Positivo	
IVS – IHQ	Negativo	24,0	5,0	29,0
	Positivo	1,0	0,0	1,0
Total		25,0	5,0	30,0

#### **4.2.2 Comparação da eficácia dos métodos de HE e IHQ na identificação de invasão vascular**

A comparação entre a capacidade de detecção de invasão vascular pelos métodos de coloração pela HE e pela IHQ mostrou algumas diferenças. Em relação à IVL, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados ( $p=0,232$ ). A presença de IVS detectada pela IHQ foi menor que a da HE ( $p=0,272$ ). O coeficiente de Kappa para a concordância diagnóstica entre ambos os métodos foi fraco para IVL (Kappa=0,211) e pobre para a IVS (Kappa=0,167) (Tabela 6).

**Tabela 6** – Comparação entre a concordância diagnóstica na detecção de IVL e IVS pela HE e pela IHQ

Parâmetros	Avaliação ao HE	Avaliação à IHQ	Valor de p	Kappa
Presença de IVL	6	9	0,232	0,211
Ausência de IVL	24	21		
Presença de IVS	5	1	0,272	0,167
Ausência de IVS	25	29		

A análise da figura 7 mostra comparativamente a detecção de IVL pela HE e à IHQ. Dentre os 6 casos com IVL detectada ao HE, 3 casos (50 %) não foram confirmados à IHQ. Em contrapartida, observamos IVL à IHQ em 6 casos (25% dos casos negativos), que não haviam sido previamente detectados pela HE ao exame histopatológico.

<b>INVASÃO VASCULAR LINFÁTICA</b>	<b>COLORAÇÃO HE</b> (pacientes)	<b>COLORAÇÃO IHQ</b> (pacientes)
	Positivos= 6	Negativos= 3
	Positivos= 3	Positivos= 3
	Negativos= 24	Negativos= 18  Positivos= 6

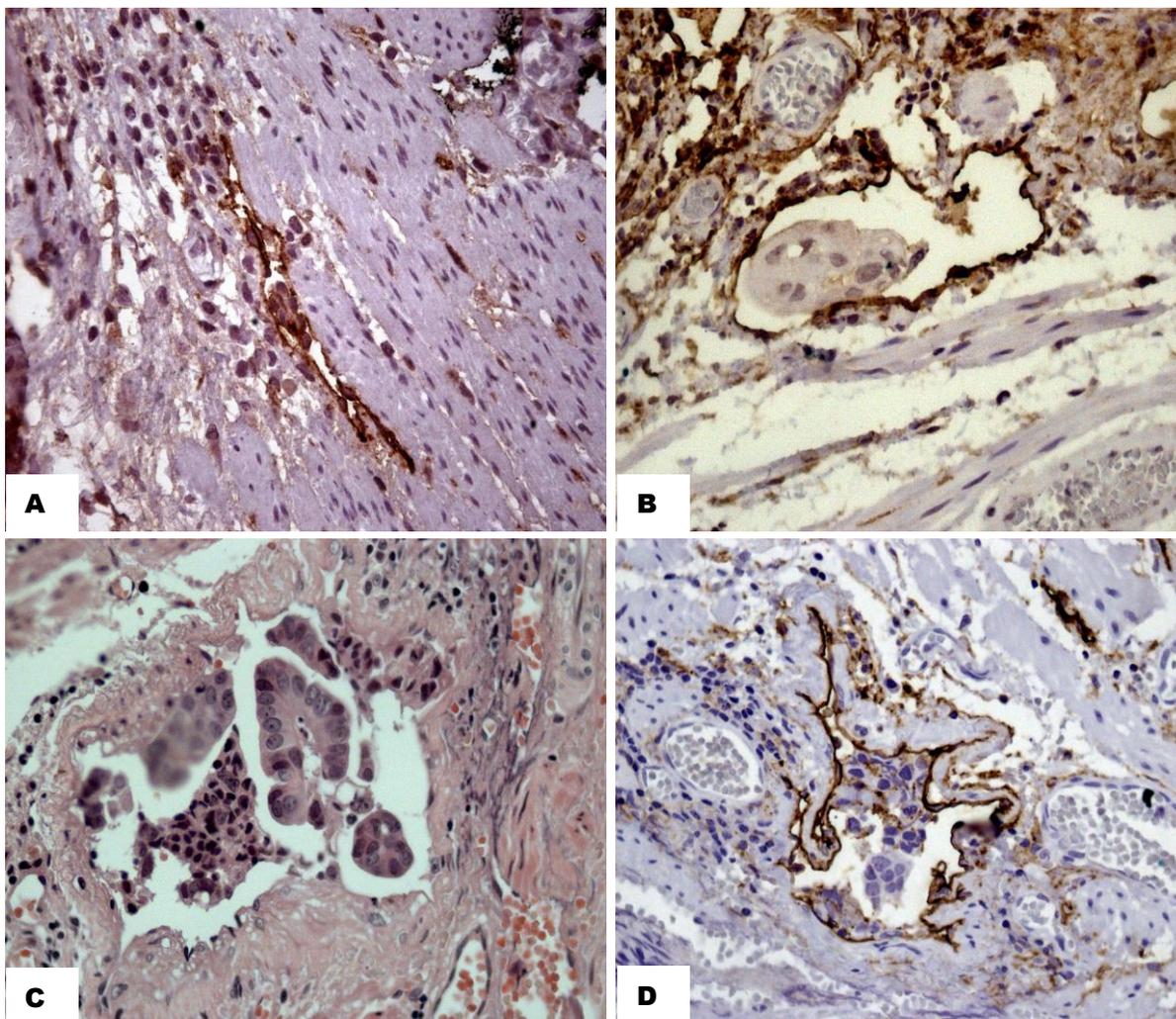
**Figura 7** – Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular linfática (IVL) em 30 casos de DES.

A figura 8 representa a avaliação comparativa da detecção de IVS pelos métodos HE e IHQ. Foram detectados 5 casos de IVS ao HE, dos quais 5 (100%) não foram confirmados pela IHQ. Dentre os casos negativos ao HE, 1 caso de IVS (4%) foi identificado à IHQ.

	<b>COLORAÇÃO HE</b> (pacientes)	<b>COLORAÇÃO IHQ</b> (pacientes)
<b>INVASÃO VASCULAR SANGUÍNEA</b>	Positivos= 5	Negativos= 5
		Positivos= 0
	Negativos= 25	Negativos= 24
		Positivos= 1

**Figura 8** – Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular sanguínea (IVS) em 30 casos de DES.

Alguns exemplos de IVL não detectadas ao exame histopatológico convencional (HE) estão demonstrados na figura 9, bem como um caso em que a IVL detectada ao HE não foi confirmada pelo exame IHQ.



**Figura 9** – Fotomicrografias de invasão vascular linfática detectada apenas pela IHQ e de falsa invasão vascular diagnosticada ao HE. **A e B:** IVL Marcação por D2-40 (x400); **C:** Falsa IVL HE (x400); **D:** Falsa IVL Marcação por D2-40 (x400).

### 4.2.3 Correlação entre variáveis clínico-patológicas e invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela IHQ

A análise de IVL detectada pelo exame IHQ, demonstrou relação estatisticamente significativa com a profundidade do tumor nas camadas m1 (p=0,031) e m3 (p=0,047), quando comparadas com os demais níveis de profundidade tumoral.

Não foi observada correlação significativa entre a presença de IVL e as seguintes variáveis: gênero, topografia e tipo histológico do tumor, assim como grau de diferenciação. Os dados estão demonstrados na tabela 7.

**Tabela 7 – Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a presença de IVL detectada à IHQ**

Parâmetros	IVL (D2-40)		Valor de P
	Negativo (%)	Positivo (%)	
<b>Gênero</b>			
<i>Masculino</i>	14 (73,69)	5 (26,3)	0,563
<i>Feminino</i>	7 (63,6)	4 (36,4)	
<b>Profundidade do tumor</b>			
<i>M1</i>	8 (100)	0 (0)	0,031
<i>M2</i>	7 (87,5)	1 (12,5)	0,221
<i>M3</i>	4 (44,5)	5 (55,5)	0,047
<i>SM1</i>	2 (50)	2 (50)	0,366
<i>SM2</i>	0(0)	1 (100)	0,129
<b>Tipo histológico da OMS</b>			
<i>Carcinoma de células escamosas</i>	12 (75)	4 (25)	0,539
<i>Adenocarcinoma</i>	8 (61,5)	5 (38,5)	0,394
<i>Anel de sinete</i>	1 (100)	0 (0)	0,522
<b>Topografia do tumor</b>			
<i>Esôfago</i>	14 (78)	4 (22,2)	0,394
<i>Estômago</i>	4 (50)	4 (50)	0,160
<i>Colón</i>	1 (50)	1 (50)	0,539
<i>Reto</i>	2 (100)	0 (0)	0,355
<b>Grau de diferenciação</b>			
<i>Bem diferenciado</i>	4 (80)	1 (20)	0,822
<i>Moderadamente diferenciado</i>	17(68)	8 (32)	0,608
<i>Pouco diferenciado</i>	-	-	-

Em relação à presença de IVS, todas as variáveis analisadas não mostraram correlação com a presença de IVS. Os dados estão demonstrados na tabela 8.

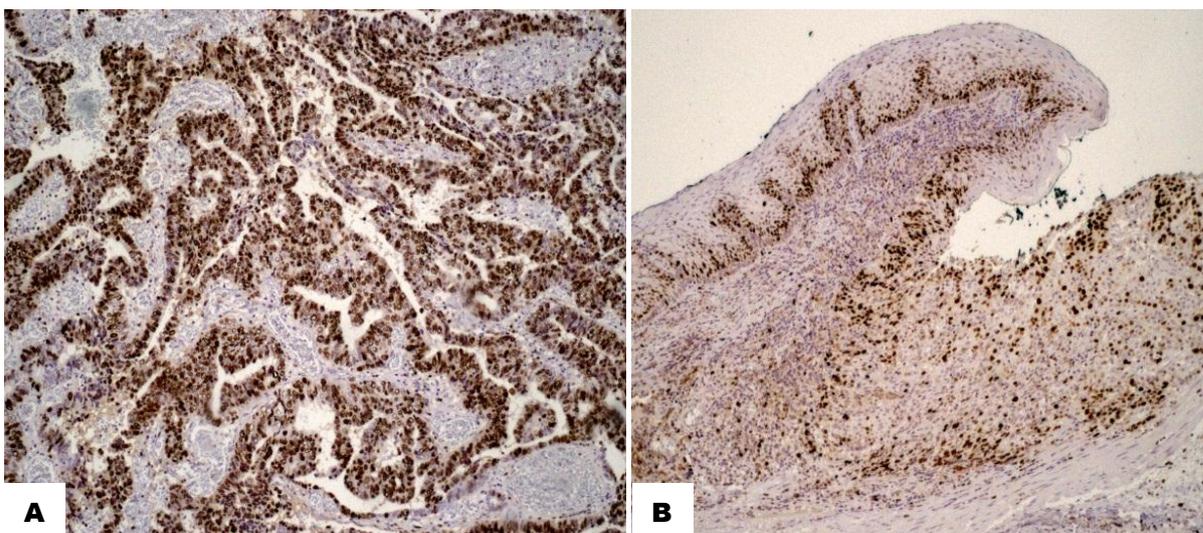
**Tabela 8** – Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a presença de IVS detectada à IHQ

Parâmetros	IVS (CD 34)		Valor de <i>P</i>
	Negativo (%)	Positivo (%)	
<b>Gênero</b>			
<i>Masculino</i>	19 (100)	0 (0)	0,054
<i>Feminino</i>	10 (90,9)	1 (9,1)	
<b>Profundidade do tumor</b>			
<i>M1</i>	7 (87,5)	1 (12,5)	0,457
<i>M2</i>	8 (100)	0 (0)	0,395
<i>M3</i>	9 (100)	0 (0)	0,539
<i>SM1</i>	4 (100)	0 (0)	0,581
<i>SM2</i>	1(100)	0 (0)	0,795
<b>Tipo histológico da OMS</b>			
<i>Carcinoma de células escamosas</i>	15 (93,75)	1 (6,25)	0,925
<i>Adenocarcinoma</i>	13 (100)	0 (0)	0,850
<i>Anel de sinete</i>	1 (100)	0 (0)	0,795
<b>Topografia do tumor</b>			
<i>Esôfago</i>	17(94,45)	1 (5,55)	0,850
<i>Estômago</i>	8 (100)	0 (0)	0,457
<i>Colón</i>	2 (100)	0 (0)	0,708
<i>Reto</i>	2 (100)	0 (0)	0,708
<b>Grau de diferenciação</b>			
<i>Bem diferenciado</i>	4 (80)	0 (0)	0,122
<i>Moderadamente diferenciado</i>	24 (96)	1 (4)	0,203
<i>Pouco diferenciado</i>	-	-	-

### 4.3 Avaliação do índice de proliferação celular

A análise do índice de proliferação celular detectada pelo exame IHQ (Ki 67), não demonstrou relação estatisticamente significativa com as variáveis analisadas. No entanto observa-se um índice de proliferação celular maior nos tumores que atingem a muscular da mucosa com uma média de 71,11% de positividade para o Ki 67, quando comparados aos demais níveis de profundidade tumoral analisados.

Quanto ao tipo histológico, os adenocarcinomas apresentaram um índice de proliferação tumoral maior, em média 65,38% de positividade para o Ki 67, quando comparados aos demais tipos histológicos (Figura 10). Os tumores moderadamente diferenciados apresentaram uma média de 60,0% de positividade para o Ki 67 e os bem diferenciados uma média de 52,50%.



**Figura 10** – Fotomicrografias do índice de proliferação celular, por meio da marcação pelo Ki 67. **A:** Adenocarcinoma (x50) e **B:** Carcinoma de células escamosas (x50).

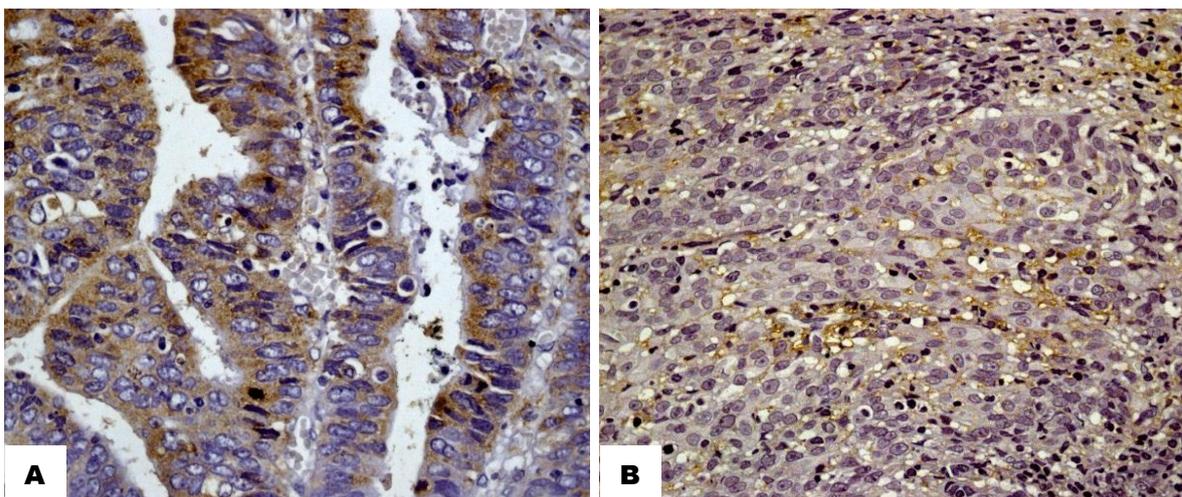
Quanto à topografia, os tumores localizados no reto apresentaram maior índice de proliferação celular, média de 70%, quando comparados às demais topografias. Os dados encontram-se na tabela 9.

**Tabela 9** – Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a média do índice de proliferação celular detectada à IHQ

Parâmetros	Ki 67	
	Ki 67 %	Valor de P
<b>Gênero</b>		
	<i>Masculino</i>	58,95
	<i>Feminino</i>	56,36
<b>Profundidade do tumor</b>		
	<i>M1</i>	57,5
	<i>M2</i>	48,75
	<i>M3</i>	71,11
	<i>SM1</i>	50
	<i>SM2</i>	50
<b>Tipo histológico da OMS</b>		
	<i>Carcinoma de células escamosas</i>	52,5
	<i>Adenocarcinoma</i>	65,38
	<i>Carcinoma de células em anel de sinete</i>	50
<b>Topografia do tumor</b>		
	<i>Esôfago</i>	56,11
	<i>Estômago</i>	65
	<i>Colón</i>	35
	<i>Reto</i>	70
<b>Grau de diferenciação</b>		
	<i>Bem diferenciado</i>	52,50
	<i>Moderadamente diferenciado</i>	60
	<i>Pouco diferenciado</i>	-

#### 4.4 Avaliação da superexpressão da proteína Her-2/neu

Todos os casos mostraram-se negativos para a superexpressão da proteína Her-2/neu (Figura 11).



**Figura 11** – Fotomicrografias do Her-2/neu. **A:** Adenocarcinoma (x400) e **B:** Carcinoma de células escamosas (x400).

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho foi norteado pelo propósito de aprimorar o estudo anatomopatológico das neoplasias epiteliais precoces do TGI em espécimes obtidos por DES.

No Brasil existem poucos serviços de endoscopia especializados, com profissionais capacitados a realizar a DES.

Dentre as vantagens da DES evidencia-se a sua importância em proporcionar um espécime ressecado em monobloco de boa qualidade que permita a avaliação anatomopatológica adequada dos seguintes fatores: dimensões da lesão, tipo histológico e grau de diferenciação da neoplasia, profundidade de invasão, presença de êmbolos de células neoplásicas em vasos sanguíneos e linfáticos e o *status* das margens cirúrgicas de ressecção laterais e profunda.

A avaliação conjunta destes fatores possibilita o diagnóstico mais preciso da neoplasia além de melhor definição do prognóstico e de condutas terapêuticas.

Além do mais, o produto de DES por ser um monobloco de dimensões consideráveis permite a realização de cortes histológicos suficientes para estudos imuno-histoquímicos com ampla gama de marcadores já conhecidos, como aqueles utilizados neste estudo, e possibilita a expansão futura para estudos adicionais de biologia molecular destas neoplasias, incluindo suas bases genéticas.

Usualmente os espécimes são enviados ao laboratório de anatomia patológica onde são analisados de acordo com os procedimentos habituais da patologia cirúrgica, via de regra, utilizando-se a coloração de rotina pela HE.

Neste estudo foi introduzido padrão de avaliação anatomopatológica mais apurado realizada mediante protocolo específico, desenvolvido para esta pesquisa, por membros dos Serviços de Endoscopia e Anatomia Patológica do Instituto ALFA de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG. A importância deste protocolo surgiu da necessidade de uniformizar as

abordagens macroscópica e microscópica dos produtos de DES e padronizar o laudo anatomopatológico final. Portanto a utilização deste protocolo serviu como guia para análise e registro padronizado e sistematizado das características gerais das neoplasias precoces do TGI tais como: tipo histológico, grau de diferenciação e profundidade de invasão.

Ademais, na análise histopatológica dos espécimes de DES é crucial definir a existência ou ausência de IVL ou IVS.

Portanto, nos 30 casos que compõem a casuística deste trabalho, adicionamos ao estudo histopatológico padronizado ao HE o método IHQ, para análise com maior sensibilidade e especificidade, de parâmetros de importante significado prognóstico e determinantes na definição da conduta pós DES. Para tal incorporamos ao protocolo a utilização de marcadores para detecção de IVL e IVS (CD34 e D2-40), proliferação celular (Ki 67) e expressão do *Her-2/neu*. Todas as lâminas obtidas dos 30 casos neste estudo coradas pela HE e IHQ foram analisadas por três observadores.

Neste trabalho, o grupo de 30 pacientes estudados refletiu o perfil geralmente descrito na literatura para as neoplasias epiteliais do TGI quanto às seguintes características: a maioria dos pacientes era do sexo masculino (63,3%) e com média de idade de 66 anos.

A análise da distribuição topográfica das neoplasias de nossa amostra revelou que em 18 pacientes elas se localizavam no esôfago (60,0%), em 8 (26,7%) no estômago, em 2 no colón (6,7%) e em 2 no reto (6,7%). O predomínio de casos de DES do esôfago poderia ser explicado, em parte, pela maior indicação deste procedimento para abordagem das neoplasias precoces uma vez que a ressecção cirúrgica do órgão apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, foi desenvolvido no IAG, estudo de rastreamento de neoplasia superficial de células escamosas de esôfago em população de alto risco por meio da endoscopia digestiva transnasal e cromoendoscopia digital (ARANTES, 2011).

A presença de êmbolos de células neoplásicas em vasos linfáticos e sanguíneos (IVL e IVS) tem sido demonstrada nas neoplasias epiteliais malignas em diversos estudos notadamente nos carcinomas de origem mamária, colorretal

e gástrica (MAEHARA et al., 1995; SETÄLÄ et al., 1996; HYUNG et al., 2004; NASU et al., 2006; TEZUKA et al., 2007; ISHII et al., 2009; KAMATA et al., 2009; MORITA et al., 2009). Alguns destes estudos utilizaram métodos de coloração pela HE e IHQ com marcadores específicos para células endoteliais e revelaram maior taxa de detecção de IVL à IHQ quando comparada ao HE (ARIGAMI et al., 2005; SAKO et al., 2006; YONEMURA et al., 2006).

Em nosso estudo a pesquisa de invasão vascular por células neoplásicas no tumor primário foi realizada inicialmente ao HE, e posteriormente pelo método IHQ, em cortes histológicos seriados e sequenciais, utilizando a combinação de dois marcadores: um deles pan-endotelial (CD34) e outro específico para o endotélio de vasos linfáticos (D2-40) para distinguir IVL de IVS.

Em relação à pesquisa de IVL, a utilização dos métodos de coloração de rotina pelo HE e IHQ, permitiu a comparação da eficácia entre ambos, demonstrando que a detecção de IVL foi maior quando utilizado o método imuno-histoquímico. A presença de IVL foi detectada em 6 casos ao HE e em 9 casos pela IHQ. Este resultado é corroborado por diversos estudos registrados na literatura reforçando assim a importância do papel da IHQ na análise da invasão vascular em neoplasias avançada e precoces (ARIGAMI et al., 2005; SAKO et al., 2006; YONEMURA et al., 2006; GRESTA, 2010). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,232$ ). Porém, quando avaliamos a tabela de qui-quadrado 2x2, observamos que, embora a pesquisa de IVL ao HE tenha sido positiva em 06 casos, em apenas 03 deles esta observação se confirmou à IHQ. Deste modo percebemos que os 03 casos restantes, que haviam sido classificados como positivos para IVL ao HE, eram portanto casos falso-positivos. Em contrapartida, a análise ao HE falhou em identificar 06 casos de IVL, que à IHQ revelaram-se positivos. Se estes 06 casos não tivessem sido submetidos à pesquisa de IVL à IHQ não seria possível identificá-los como falso-negativos. Estes resultados geraram um coeficiente de concordância muito baixo ( $Kappa=0,211$ ) devido ao fato de que muitos casos foram falso-positivos e falso-negativos.

É importante ressaltar que, na prática rotineira do patologista, a análise histopatológica das lâminas coradas pelo HE, com o intuito de detectar IVL, está

sujeita a esses equívocos. Utilizando apenas esta coloração de rotina, o patologista pode não ser capaz de distinguir artefatos de retração ao redor de agrupamentos de células ou glândulas neoplásicas de invasão vascular verdadeira. Esta dificuldade se verifica também em casos onde os êmbolos neoplásicos preenchem totalmente o lúmen vascular, impossibilitando a sua identificação sem a marcação específica do endotélio linfático. Além do mais, resultados falso-positivos para IVL podem ocorrer também quando a presença de IVS for interpretada erroneamente como IVL ao HE. Essas discrepâncias foram também observadas em outras séries de estudos, enfocando principalmente carcinomas gástricos (ARIGAMI et al., 2005; SAKO et al., 2006; YONEMURA et al., 2006; GRESTA, 2010).

A presença de IVL no tumor primário tem sido considerada fator de risco independente para a ocorrência de metástases linfonodais em diversos tipos de neoplasia, sendo portanto, fenômeno essencial para a ocorrência de metástases linfonodais (PANTEL, BRAKENHOFF, 2004).

Em relação à avaliação de IVS nos cortes histológicos corados pelo método de rotina HE, obtivemos 05 casos positivos. Porém a pesquisa à IHQ não confirmou a positividade observada ao HE em nenhum destes casos. Portanto estes 05 casos correspondem a resultados falso-positivos para IVS ao HE. Em contrapartida, dentre 25 casos considerados negativos para IVS ao exame convencional pela HE, quando submetidos à IHQ, identificamos 01 caso positivo para IVS, evidenciando-se assim um caso falso-negativo ao HE. Apesar da evidente discordância entre os achados ao HE e à IHQ em 06 casos (20%) da amostra não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,272$ ). Esse viés poderia ser atribuído ao fato de que dentre estes casos alguns possam ter sido erroneamente interpretados como IVS ao invés de IVL ou mesmo tratarem-se de retração tecidual em torno de células neoplásicas na avaliação ao HE, uma vez que esta coloração não possibilita a distinção adequada entre estes fatores em todos os casos (Van Den EYNDEN et al., 2006).

Contudo o coeficiente de concordância Kappa entre ambos os métodos foi de apenas 0,167, evidenciando assim o grau de concordância pobre entre o

HE e a IHQ para pesquisa de IVS. Este resultado poderia ser justificado pelo expressivo número de casos falso-positivos (5 em 30 casos).

A presença de IVS não se correlacionou com nenhuma das características clínico-patológicas da neoplasia.

A IVL e IVS são parâmetros a serem analisados sistematicamente ao exame histopatológico devido ao seu importante significado prognóstico e determinante na escolha da terapêutica complementar após a DES. Portanto, devem ser avaliados pelos métodos mais sensíveis e específicos disponíveis e incorporados ao protocolo do exame histopatológico de rotina.

Nossos resultados mostram que a aplicação do método IHQ utilizando os dois marcadores combinados (CD34 e D2-40) é superior na detecção de IVL e IVS, quando comparada à coloração de rotina pela HE, podendo ser de grande valor na prática clínica, especialmente nos casos de neoplasias precoces retiradas por DES onde não é possível determinar o estadiamento linfonodal. Esta informação é ainda mais relevante quando existe invasão da camada muscular da mucosa ou do terço superficial da camada submucosa (sm1) nos produtos de DES do esôfago, visto que a coexistência de IVS ou IVL nesta situação eleva de forma significativa o risco de metástase linfonodal (19,6%) (FUJISHIRO, 2008; REPICI et al., 2010).

A análise da profundidade da invasão tumoral na parede dos órgãos mostrou que a maioria de neoplasias precoces do TGI abordadas neste estudo eram tumores intramucosos (83,3%) e submucosos superficiais (13,3%) demonstrando, portanto, que praticamente todos os casos preenchem os critérios preconizados para indicação da DES. Somente um caso (3,4%) atingia o terço médio da camada submucosa (Sm2) o que foi evidenciado apenas à análise histopatológica.

É interessante assinalar que, em nosso estudo, obtivemos correlação estatisticamente significativa entre a profundidade de invasão tumoral (m1 e m3) e a presença de invasão vascular linfática ( $p=0,031$  e  $p=0,047$ ).

De modo geral acredita-se que nos casos de carcinomas precoces, há menor probabilidade de ocorrência de invasão neoplásica em vasos sanguíneos e linfáticos. Entretanto, estudos sobre a densidade da rede linfática na parede

dos órgãos do TGI, em especial na parede gástrica normal, atestam que a concentração de vasos linfáticos é consideravelmente maior na muscular da mucosa, camada que pode estar infiltrada nas neoplasias chamadas precoces (SAKO et al., 2006). Estes estudos corroboram o resultado estatisticamente significativo que obtivemos entre a correlação da profundidade da invasão tumoral e IVL na camada m3.

A correlação estatisticamente significativa de profundidade de invasão tumoral na camada m1 e IVL deve-se ao fato de não ter casos positivos para IVL nesta camada por tratarem-se de neoplasias restritas ao epitélio (*in situ*).

A correlação entre proliferação celular, avaliada neste estudo à IHQ com o marcador Ki 67, e profundidade de invasão tumoral mostrou que as neoplasias que se encontravam nas camadas m1 e m3 apresentaram os maiores índices de proliferação celular (57,5% e 71,1%), quando comparadas às demais camadas. Este resultado paradoxal pode ser explicado porque 25 dos 30 casos estudados eram representados por neoplasias intramucosas (83,3%) contra apenas 5 casos nos quais a neoplasia atingia a camada submucosa (16,7%).

A análise da superexpressão da proteína Her-2/*neu* à IHQ revelou-se negativa em todos os 30 casos do nosso estudo. Este resultado era esperado já que nossa casuística é composta exclusivamente por neoplasias precoces do TGI e não por neoplasias avançadas que, por apresentarem maior agressividade exibem, com maior frequência, a superexpressão desta proteína. Entretanto, resolvemos incluir a pesquisa da superexpressão da proteína Her-2/*neu* neste estudo porque, até o presente momento, não há, na literatura, relatos de séries de casos de neoplasias precoces do TGI, submetidas à DES, nos quais esta pesquisa tenha sido feita.

Ainda não está completamente esclarecida, nos trabalhos publicados na literatura, a relação entre a superexpressão do Her-2 e o prognóstico de pacientes com carcinoma de esôfago. Tem sido sugerido que pacientes com carcinoma de células escamosas esofágicas, positivos para Her-2 apresentem menor taxa de sobrevida porque estes tumores tem, de modo geral, maior resistência à terapia com radiação e quimioterapia baseada em cisplatina (CHAN et al., 2012). Portanto, o uso deste receptor como alvo terapêutico para o

tratamento do carcinoma de esôfago tem papel limitado devido aos seguintes fatores: a frequência da superexpressão de Her-2 no câncer esofágico ser baixa e extremamente variável e sua relação com o prognóstico não ser ainda definida (WEI et al., 2007; MOELANS et al., 2011).

Estudo anterior demonstrou que em relação CG o *status* Her2-positivo parece estar associado a pior prognóstico, evolução mais agressiva e, portanto, menor sobrevida (RÜSCHOFF et al., 2010). Esta observação justificaria, pelo menos em parte, o resultado obtido em nosso estudo: os 08 casos de carcinoma gástrico foram negativos por se tratarem de neoplasias precoces.

No que diz respeito ao carcinoma colorretal, embora Her-2 tenha sido postulado como marcador de prognóstico biológico, existem dados conflitantes sobre a prevalência da superexpressão desta proteína, bem como sua relação com o prognóstico (PARK et al., 2007; LI et al., 2011). Em nosso estudo nos quatro casos de carcinoma colorretal analisados não observamos a superexpressão de Her-2/neu.

Compete ao endoscopista selecionar adequadamente o caso em que a DES esteja bem indicada após efetuar estadiamento pré-operatório minucioso. Durante o procedimento de ressecção, é crucial estudar bem a lesão com recursos de cromoscopia e magnificação e definir os seus limites, bem como delinear a margem de ressecção. O endoscopista deve realizar a técnica com esmero, evitando coagulação excessiva, bem como fragmentação do espécime, e respeitando-se as margens de ressecção. Finalmente, após a extração da peça, é fundamental que a mesma seja estirada em placa de isopor, fixada com alfinetes, imersa em frasco próprio preenchido com solução de formalina a 10% e enviada ao laboratório de anatomia patológica.

Ressalta-se, ainda, que tão importante quanto à atuação do endoscopista na realização da DES é o papel do patologista no manejo adequado dos espécimes obtidos. A abordagem destes espécimes deve ser feita de maneira sistematizada e padronizada segundo protocolo específico e inclui todas as etapas do exame anatomopatológico macro e microscópico. Durante a realização da macroscopia o patologista deve fazer a marcação da face cruenta com tinta nanquim, cortes seriados de 2mm de espessura e submeter todo o

material para processamento histológico. Ao exame microscópico devem ser avaliados, tipo histológico e grau de diferenciação da neoplasia, profundidade da invasão tumoral, presença de êmbolos de células neoplásicas em vasos sanguíneos e linfáticos e o estado das margens de ressecção laterais e profunda (FUJISHIRO, 2008).

Até o presente momento, não há nenhuma modalidade de exame de imagem capaz de avaliar adequadamente a presença de metástases linfonodais nos carcinomas precoces do TGI.

Assim, quando estas neoplasias são submetidas à DES, o estadiamento pelo sistema TNM, no que diz respeito ao N, fica comprometido uma vez que não pode ser realizado de forma absolutamente confiável por métodos de imagem.

Nesses casos o estadiamento do linfonodo pode ser inferido pela avaliação de alguns parâmetros ou fatores que estão relacionadas à maior ocorrência de metástases linfonodais: tipo histológico da neoplasia, profundidade da invasão tumoral na parede do órgão, dimensões da lesão, grau de diferenciação e a presença de IVL. Dentre estes fatores a presença de IVL é o fator preditivo mais significativo para a ocorrência de metástases linfonodais (AN et al., 2007).

Este estudo indica que a análise histopatológica dos produtos de DES realizando exclusivamente a coloração de rotina HE, como usualmente ocorre, não permite a avaliação adequada da presença de IVS ou IVL.

A definição precisa de IVS ou IVL é um dado essencial para definir o potencial curativo da DES em cada caso e direcionar a conduta subsequente que poderá ser apenas o acompanhamento endoscópico daqueles pacientes considerados tratados curativamente ou mesmo o redirecionamento dos demais pacientes para procedimentos terapêuticos complementares como quimioterapia, radioterapia, linfadenectomia regional ou até mesmo ressecção cirúrgica do órgão (KIM et al., 2012).

O presente estudo contribuiu para ampliar e refinar o protocolo de abordagem histopatológica dos produtos de DES, demonstrando a importância da inclusão rotineira de estudos imuno-histoquímicos para pesquisa de IVS e IVL (CD34 e D2-40) em adição ao estudo detalhado pela coloração HE. A

pesquisa dos marcadores de proliferação celular (ki67) e superexpressão da proteína Her-2/neu não se mostraram relevantes nesta série, sendo necessários maiores estudos para definir a real necessidade da pesquisa destes marcadores neste contexto.

A avaliação histopatológica conjunta ao HE e à IHQ com CD34 e D240 possibilita a obtenção de todas as informações cruciais que possam ser extraídas do produto de DES resultando no aprimoramento do estadiamento da neoplasia.

## 6. CONCLUSÕES

- A análise macroscópica e microscópica sistematizada dos espécimes de DES feita mediante protocolo padronizado permite diagnóstico mais aprimorado das neoplasias precoces do TGI.
- O aprimoramento do diagnóstico nos espécimes de DES possibilita melhor definição do prognóstico, constituindo uma das ferramentas que norteiam o acompanhamento e conduta pós-DES.
- A detecção de IVL e IVS, apresenta maior acuidade à IHQ quando comparada à coloração de rotina pelo HE.
- A evidência de IVL e IVS comprovada à IHQ, nos espécimes de DES, pode indicar a necessidade de condutas terapêuticas complementares.
- A presença de IVL se correlaciona com a profundidade de invasão tumoral na parede dos órgãos do TGI, em especial nas neoplasias que atingem as camadas m1 e m3.
- As neoplasias precoces do TGI restritas à mucosa submetidas a DES não superexpressam a proteína Her-2/neu

## PERSPECTIVAS

Este trabalho de dissertação foi concluído, para efeito de defesa do mestrado, incluindo-se os 30 primeiros casos consecutivos de DES realizados no Serviço de Endoscopia do IAG/HC/UFMG.

Porém, o estudo tem se mantido em andamento uma vez que todos os espécimes de DES, realizados após o fechamento da presente casuística, continuam e continuarão sendo sistematicamente analisados, macro e microscopicamente, no Serviço de Anatomia Patológica do IAG/HC/UFMG, mediante protocolo padronizado, exatamente como o proposto para este estudo. O protocolo inclui a pesquisa de IVL e IVS e de proliferação celular (Ki67) à IHQ.

Acreditamos que uma casuística maior poderá corroborar, ainda mais, os resultados obtidos.

Além do mais, estudos clínicos poderiam ser conduzidos comparando o tempo de sobrevida livre de doença nos pacientes submetidos a DES, na presença e ausência de IVL ou IVS comprovadas a IHQ. Outros estudos clínicos poderiam ainda comparar o tempo de sobrevida dos pacientes submetidos à DES com IVL e/ou IVS submetidos ou não à terapêutica complementar.

## REFERÊNCIAS

AALTONEN, L. A. et al. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distribuidor, 2000. (World Health Organization classification of tumours.).

ABE, N. et al. Multicenter study of the long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients 80 years of age or older. *Gastric Cancer*. 2012;15(1):70-5.

ALBARELLO, L.; PECCIARINI, L.; DOGLIONI, C. HER2 testing in gastric cancer. *Adv Anat Pathol*. 2011; 18(1): 53-9.

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. Manual de Imuno-histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

AMIOKA, T. et al. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer*. 2002;38:1413-9.

AN, J.Y. et al. Predictive factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: analysis of a single institutional experience. *Ann Surg [S.I.]*, v. 246, n. 5, p. 749-53, Nov 2007.

ANG, T. L.; KHOR, C. J. L.; GOTODA, T. Diagnosis and endoscopic resection of early gastric cancer. *Singapore Med J*. 2010;51(2):93-100.

ARANTES, V. N. Rastreamento do câncer de esôfago pela endoscopia digestiva transnasal e cromoendoscopia em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Clínica Médica] 2011 – Universidade Federal de Minas Gerais.

ARANTES, V. ET al. Tratamiento endoscópico del carcinoma escamoso precoz de esófago por la disección endoscópica de submucosa. *Revista GEN* 2012. In press.

ARIGAMI, T. et al. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer*. 2005;93: 688-93.

ARNAOUT-ALKARAIN, A. et al. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol* [S.l.], v. 20, n. 2, p. 183-91, Feb 2007.

BANG, Y. J. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010; 376: 687-97.

CABRAL, M. M. D. A. Estudo topográfico do padrão da gastrite crônica, proliferação celular e apoptose na mucosa gástrica na infecção por *Helicobacter pylori*: correlação com o status cagA. Belo Horizonte. Tese [Doutorado] Patologia Médica. 2006, Universidade Federal de Minas Gerais.

CHAN, D. S. Y.; TWINE, C.P.; LEWIS, W. G. Systematic review and meta-analysis of the influence of HER2 expression and amplification in operable oesophageal cancer. *J Gastrointestinal Surg*. 2012;16:1821-29.

CHAVES, D. M. et al. Endoscopic submucosal dissection for the treatment of early esophageal and gastric cancer – initial experience a western center. *Clinics*. 2010; 65(4):377-82.

CHOI, P. W. et al. Risk factors for lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal cancer. *World J Surgery*. 2008;32:2089-94.

DEMIRBAS, S. et al. Influence of the c-erb B-2, nm23, bcl-2 and p53 protein markers on colorectal cancer. *Turk J Gastroenterol*. 2006;17:13-9.

DING, S. et al. Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD 105 in benign and malignant gastric lesions. *Hum Pathol*. 2006;37:861-6.

DU, J. R. et al. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2003;9(7):1604-6.

DUCHROW, M. et al. Colorectal carcinomas with high MIB-1 labelling índices but low pki67 mRNA levels correlate with better prognostic outcome. *Histopathology*. 2003; 42:566-74.

ELPEK, G. O. et al. Microvessel count, proliferating cell antigen and Ki-67 indices in gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2000;6(1):59-64.

FOLLI, S. et al. Risk factors for lymph node metastases and their prognostic significance in early gastric cancer (EGC) for the Italian Research Group for Gastric Cancer (IRGGC). *Jpn J Clin Oncol* [S.l.], v. 31, n. 10, p. 495-9, Oct 2001.

FUJISHIRO, M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasm. *World J Gastroenterol*. 2008;27:4289-4295.

GOTODA, T. et al. Evaluation of the necessity for gastrectomy with lymph node dissection for patients with submucosal invasive gastric cancer. *Br J Surg [S.I.]*, v. 88, n. 3, p. 444-9, Mar 2001.

GRESTA, L. T. Análise comparativa da eficácia do método imuno-histoquímico (D2-40 e CD34) e da coloração de rotina (HE) para detecção de invasão vascular linfática e sanguínea no carcinoma gástrico: correlação com outros indicadores prognósticos. Belo Horizonte. Dissertação [Patologia] – Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.

GURZU, S. et al. The correlation between the immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 expression and classical prognostic factors in colorectal carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2007;48(2):95-9.

HA, T. K. et al. Indication for endoscopic mucosal resection in early signet ring cell gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2007;15:508-13.

HAMANAKA, H.; GOTODA, T. Endoscopic resection for early gastric cancer and future expectations. *Digestive Endoscopy*. 2005;17:275-85.

HANAOKA, N. et al. Mixed-histologic-type submucosal invasive gastric cancer as a risk factor for lymph node metastasis: feasibility of endoscopic submucosal dissection. *Endoscopy [S.I.]*, v. 41, n. 5, p. 427-32, May 2009.

HARRIS, E. L. et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surgical Pathology*. 2008;32: 1816-21.

HE, Y. et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3-signaling. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(11):819-25.

HE, Z. et al. The potential of carcinoembryonic antigen, p53, Ki-67 and glutathion S-transferase as clinico-histopathological markers for colorectal cancer. *Journal of Biomedical Research*. 2010;24(1):51-7.

HICKS, D. G.; MILLER, C. W. HER2 testing in gastric and gastroesophageal junction cancers: a new therapeutic target and diagnostic challenge. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(6):506-8.

HOFMANN, M. et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008; 52: 797-805.

HUH, J. W.; KIM, H. R.; KIM, Y. J. Lymphovascular or perineural invasion may predict lymph node metastasis in patients with T1 and T2 colorectal cancer. *J Gastrointestinal Surgery*. 2010;14:1074-80.

HYUNG, W. J. et al. Application of minimally invasive treatment for early gastric cancer. *J Surgical Oncology [S.I.]*. Mar 2004;v.85,n 4, p.181-5.

ICHIKAWA, D. et al. Prognostic impact of lymphatic invasion in patients with node-negative gastric cancer. *J Surg Oncol [S.I.]*, May 27 2009.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil [homepage na internet]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 28 outubro 2012.

ISHII, M. et al. Lymphatic vessel invasion detected by monoclonal antibody D2-40 as a predictor of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis [S.I.]*, v. 24, n. 9, p. 1069-74, Sep 2009.

ISHIKAWA, Y. et al. Significance of lymphatic invasion and proliferation on regional lymph node metastasis in renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol [S.I.]*, v. 128, n. 2, p. 198-207, Aug 2007.

JESUS, E. C. et al. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins. *Acta Cir Bras*. 2005;20:422-7.

JI, R. C. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev [S.I.]*, v. 25, n. 4, p. 677-94, Dec 2006.

JOO, Y. E. et al. Expression of Cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in Gastric Cancer. *J Korean Med Sci*. 2006;21:871-6.

KAHN, H.; MARKS, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest [S.I.]*, v.82, n.9, p. 1255-7, 2002.

KAMATA, I. et al. Significance of lymphatic invasion and cancer invasion-related proteins on lymph node metastasis in gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol [S.I.]*, Mar 10 2009.

KIM, J. H. et al. Clinical Significance of Immunohistochemically-Identified Lymphatic and/or Blood Vessel Tumor Invasion in Gastric Cancer. *J Surg Res [S.I.]*, Aug 2009.

KIM, J.H. et al. Additive lymph node dissection may be necessary in minute submucosal cancer of the stomach after endoscopic resection. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19(3):779-85.

KIM, K. C. et al. Evaluation of HER2 protein expression. in gastric carcinomas: comparative analysis of 1414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(10):2833-40.

KUWABARA, Y. S. et al. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry. *BMC Cancer*. 2009;9:1-10.

KWEE, R.; KWEE, T. Predicting lymph node status in early gastric cancer. *Gastric Cancer [S.I.]*, v. 11, n. 3, p. 134-48, 2008.

LANDIS, J. R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33 (1): 159-74.

LAZAR, D. et al. Ki-67 expression in gastric cancer. Results from a prospective study with long-term follow-up. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2010; 51(4): 655-61.

LEE, C. C. et al. Survival predictors in patients with node-negative gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol [S.I.]*, v.22, n.7, p.1014-8, Jul 2007.

LEE, K. et al. Increased intratumoral lymphatic vessel density correlates with lymph node metastasis in early gastric carcinoma. *Annals Surgical Oncology*. 2010;17:73-80.

LI, C. et al. Risk factors for lymph node metastasis in undifferentiated early gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2007;15: 764-9.

LI, H. et al. Predictive factors for lymph node metastasis in poorly differentiated early gastric cancer and their impact on the surgical strategy. *World J Gastroenterol [S.I.]*, v. 14, n. 26, p. 4222-6, Jul 2008.

LI, Q. et al. Clinicopathological and prognostic significance of HER-2/neu and VEGF expression in colon carcinomas. *BMC Cancer*. 2011; 11:277-82.

LIN, M. et al. Intratumoral as well as peritumoral lymphatic vessel invasion correlates with lymph node metastasis and unfavourable outcome in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2010; 27:123-32.

LIU, C. et al. Prognostic role of lymphatic vessel invasion in early gastric cancer: A retrospective study of 188 cases. *Surg Oncol [S.I.]*, Nov 2008.

MAEHARA, Y. et al. Predictors of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg [S.I.]*, v. 79, n. 3, p. 245-7, Mar 1992.

MAEHARA, Y. et al. Lymphatic invasion and potential for tumor growth and metastasis in patients with gastric cancer. *Surgery [S.I.]*. 1995;v.117, n. 4, p. 380-5.

MARKS, A. et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer [S.I.]*, v. 80, n. 3-4, p. 569-78, May 1999.

MOELANS, C. B. et al. HER-2/neu testing and therapy in gastroesophageal adenocarcinoma. *Patholog Res Int*. 2010; 6:674182.

MOELANS, C. B. et al. Low frequency of HER2 amplification and overexpression in early onset gastric cancer. *Cell Oncol*. 2011;34:89-95.

MOHAMMED, R. A.. et al. Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. *Am J Surg Pathol [S.I.]*, v. 31, n. 12, p. 1825-33, Dec 2007.

MORITA, H. et al. Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch [S.I.]*, v. 454, n. 2, p. 143-51, Feb 2009.

NAKAMURA, Y. et al. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol*. 2006;59:77-82.

NASU, J. et al. Predictive factors of lymph node metastasis in patients with undifferentiated early gastric cancers. *J Clin Gastroenterol [S.I.]*, v. 40, n. 5, p. 412-5, May-Jun 2006.

OCHS, A. M. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and HER2/neu in stage II colon cancer and correlation with survival. *Clinical Colorectal Cancer*. 2004;4:262-7.

- PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* [S.I.]. Jun 2004;v. 4, n. 6, p. 448-56.
- PARK, D. I. et al. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22:491-7.
- PARK, D. I. et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2006;51:1371-9.
- PARK, Y. M. et al. The effectiveness and safety of endoscopic submucosal dissection compared with endoscopic mucosal resection for early gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Endosc.* 2011;25(8):2666-77.
- PRADEEP, C. R.; SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF Receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther.* 2005;4(4):315-21.
- PRENZEL, K. L. et al. Prognostic impact of nodal micrometastasis in early esophageal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2012;38(4):314-8.
- RAHADIANI, N. et al. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17: 1311-1323.
- REPICI, A. et al. Endoscopic submucosal dissection in patients with early esophageal squamous cell carcinoma: results from a prospective Western series. *Gastrointestinal Endoscopy.* 2010;71: 715-721.
- ROMA, A. A. et al. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 392-8, Mar 2006.
- RÜSCHOFF, J. et al. HER2 diagnostics in gastric cancer – guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch.* 2010; 457: 299-307.
- RÜSCHOFF, J. et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathology.* 2012; 25(5):637-50.
- SAITO, Y. et al. A prospective, multicenter study of 1111 colorectal endoscopic submucosal dissections (with video). *Gastrointestinal Endoscopy.* 2010; 72(6):1217-25.
- SAKO, A. et al. Impacto of immunohistochemically identified lymphatic invasion on nodal metastasis in early gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2006; 9: 295-302.

SALMINEN, E. et al. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11(21):3245-9.

SETÄLÄ, L. P. et al. Prognostic factor in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *British J Cancer*. 1996;74:766-72.

SHAH, S.; CHEN, B. Testing HER2 in breast cancer: A continuing evolution. *Pathol Res Int*. 2010; 6 (2011):903202.

SHEN, L. et al. Clinicopathological features associated with lymph node metastasis in early gastric cancer: analysis of a single-institution experience in China. *Can J Gastroenterol [S.I.]*, v. 23, n. 5, p. 353-6, May 2009.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. H. TNM classification of malignant tumours. New York: J. Wiley, 2002.

TALAMONTI, M. S. et al. Surgical outcomes of patients with gastric carcinoma: the importance of primary tumor location and microvessel invasion. *Surgery [S.I.]*, v. 134, n. 4, p. 720-7; discussion 727-9, Oct 2003.

TENDERENDA, M. et al. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(2): 129-134.

TEZUKA, K. et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion diagnosed by lymphatic endothelium immunostaining in breast cancer patients. *Oncol Rep [S.I.]*, v. 17, n. 5, p. 997-1003, May 2007.

THOMPSON, S. K. et al. HER-2/neu gene amplification in esophageal adenocarcinoma and its influence on survival. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(7): 2010-7.

TONG, L. et al. Role of podoplanin expression. in esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective study. *Diseases of the esophagus*. 2012; 25(1): 72-80.

Van DEN EYNDEN, G. G. et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer [S.I.]*, v. 94, n. 11, p. 1643-9, Jun 5 2006.

Van der AUWERA, I. et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006;95:1611-25.

WANG, W. C. et al. Ki-67 and ProExC are useful immunohistochemical markers in esophageal squamous intraepithelial neoplasia. *Human Pathology*. 2011; 42: 1430-37.

WANG, X. L. et al. Different significance between intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density in gastric cancer: a retrospective study of 123 cases. *BMC Cancer*. 2010; 10: 299-310.

WEI, Q. et al. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases. *International Journal of Oncology*. 2007;31:493-9.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;332(1):1-8.

WHO - Organização Mundial de Saúde: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase [homepage na internet]. - GLOBOCAN – 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em 28 outubro 2012.

XIE, S. D. et al. HER2/neu protein expression. in gastric cancer is associated with poor survival. *Molecular Medicine Reports*. 2009;2:943-6.

YAN, B. et al. A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer. *J Clin Pathol*. 2010; 63:839-42.

YAN, S. Y. et al. Clinicopathologic significance of HER-2/neu protein expression and gene amplification in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2011; 17(11):1501-6.

YONEMURA, Y. et al. Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40. *Hum Pathol*. 2006;37:1193-9.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Aprovação do trabalho pelo COEP - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Projeto: CAAE – 0310.0.203.000-11**

**Interessado(a): Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral  
Depto. de Anatomia Patológica e Medicina Legal  
Faculdade de Medicina - UFMG**

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de setembro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Importância do estudo imuno-histoquímico no estadiamento das neoplasias precoces do trato gastrointestinal submetidas a dissecação endoscópica da submucosa (DES): análise da invasão vascular sanguínea e linfática, índice de proliferação celular e expressão celular e expressão do Her-2/neu e sua correlação com características anátomo-patológicas destas neoplasias"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO 2 – Protocolo aplicado no estudo****PROTOCOLO DE PESQUISA****Data**

- |                  |        |                |
|------------------|--------|----------------|
| - Nome           |        | - N Biópsia    |
| - Idade          | - Sexo | - Registro     |
| - Biópsia prévia |        | - N Endoscopia |

- |  |                      |
|--|----------------------|
| - Amostra recebida com representação até |                      |
| ↑ Lâmina própria                         | ↑ Muscular da mucosa |
| ↑ Submucosa                              | ↑ Muscular própria   |

- |                       |           |               |
|-----------------------|-----------|---------------|
| - Topografia do tumor |           |               |
| ↑ Estômago            | ↑ Esôfago | ↑ Duodeno     |
| ↑ Colón               | ↑ Reto    | ↑ Outro _____ |

- Tipo Histológico
- 
- 

- |                         |                              |                      |
|-------------------------|------------------------------|----------------------|
| - Grau de Diferenciação |                              |                      |
| ↑ Bem diferenciado      | ↑ Moderadamente diferenciado | ↑ Pouco diferenciado |

- Tamanho do tumor \_\_\_\_\_

- Margens

- |           |            |            |            |
|-----------|------------|------------|------------|
| - Lateral | ↑ presente | - Profunda | ↑ presente |
|           | ↑ ausente  |            | ↑ ausente  |

- Invasão

- |              |            |                      |            |
|--------------|------------|----------------------|------------|
| - Perineural | ↑ presente | - Vascular sanguínea | ↑ presente |
|              | ↑ ausente  |                      | ↑ ausente  |

- |                      |            |
|----------------------|------------|
| - Vascular Linfática | ↑ presente |
|                      | ↑ ausente  |

- Medidas

- Espessura total do fragmento (EST) \_\_\_\_\_
- Profundidade do tumor (PT) \_\_\_\_\_
- Profundidade do tumor na mucosa (PTM) \_\_\_\_\_
- Menor margem cirúrgica (MMC) \_\_\_\_\_
- Maior dimensão do tumor (MDT) \_\_\_\_\_
- Medida endoscópica do espécime \_\_\_\_\_

- Marcadores Imuno-histoquímicos

- |         |            |        |            |
|---------|------------|--------|------------|
| - Her2  | ↑ positivo | - CD34 | ↑ positivo |
|         | ↑ negativo |        | ↑ negativo |
| - D2-40 | ↑ positivo | - Ki67 | ↑ alto     |
|         | ↑ negativo |        | ↑ moderado |
|         |            |        | ↑ baixo    |

### ANEXO 3 - Declaração de aprovação



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

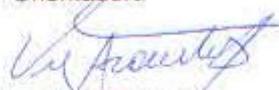
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (31) 3409.9641 - FAX: (31) 3409.9640  
[cpq@medicina.ufmg.br](mailto:cpq@medicina.ufmg.br)

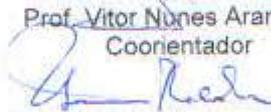


### DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Mônica Maria Demas Álvares Cabral, Vitor Nunes Arantes, Paulo Roberto Savassi e Claudio Rolim Teixeira, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“IMPORTÂNCIA DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO NO ESTADIAMENTO DAS NEOPLASIAS PRECOSES DO TRATO GASTROINTESTINASUBMETIDAS A DISSECÇÃO ENDOSCÓPICA DA SUBMUCOSA (DES): ANÁLISE DA INVASÃO VASCULAR SANGUÍNES E LINFÁTICA, ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DO HER-2/NEU E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS DESTAS NEOPLASIAS”**, apresentada pela mestranda **NAYZE LUCENA SANGREMAN ALDEMAN**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Investigativa, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 30 de outubro de 2012.

  
Prof.ª Mônica Maria Demas Álvares Cabral  
Orientadora

  
Prof. Vitor Nunes Arantes  
Coorientador

  
Prof. Paulo Roberto Savassi Rocha

  
Prof. Cláudio Rolim Teixeira

## ANEXO 4 – Ata da defesa


**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 - sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100  
Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-0640  
[www.medicina.ufmg.br](http://www.medicina.ufmg.br)



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado de NAYZE LUCENA SANGREMAN ALDEMAN, nº de registro 2011655930. Às quatorze horas do dia 30 de novembro de dois mil e doze, reuniu-se no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "IMPORTÂNCIA DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO NO ESTADIAMENTO DAS NEOPLASIAS PRECOSES DO TRATO GASTROINTESTINAISUBMETIDAS A DISSECCÃO ENDOSCÓPICA DA SUBMUCOSA (DES): ANÁLISE DA INVASÃO VASCULAR SANGÜÍNES E LINFÁTICA, ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DO HER-2/NEU E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS DESTAS NEOPLASIAS", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Investigativa. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Vitor Nunes Arantes/Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Paulo Roberto Savassi Rocha	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Claudio Rolim Teixeira	Instituição: FUGAST	Indicação: <u>APR-VAR</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada \_\_\_\_\_.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de novembro de 2012.

Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral \_\_\_\_\_  
 Prof. Vitor Nunes Arantes \_\_\_\_\_  
 Prof. Paulo Roberto Savassi Rocha \_\_\_\_\_  
 Prof. Claudio Rolim Teixeira \_\_\_\_\_  
 Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) \_\_\_\_\_

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina / UFMG

CONFERE COM ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG  
12/11/2012