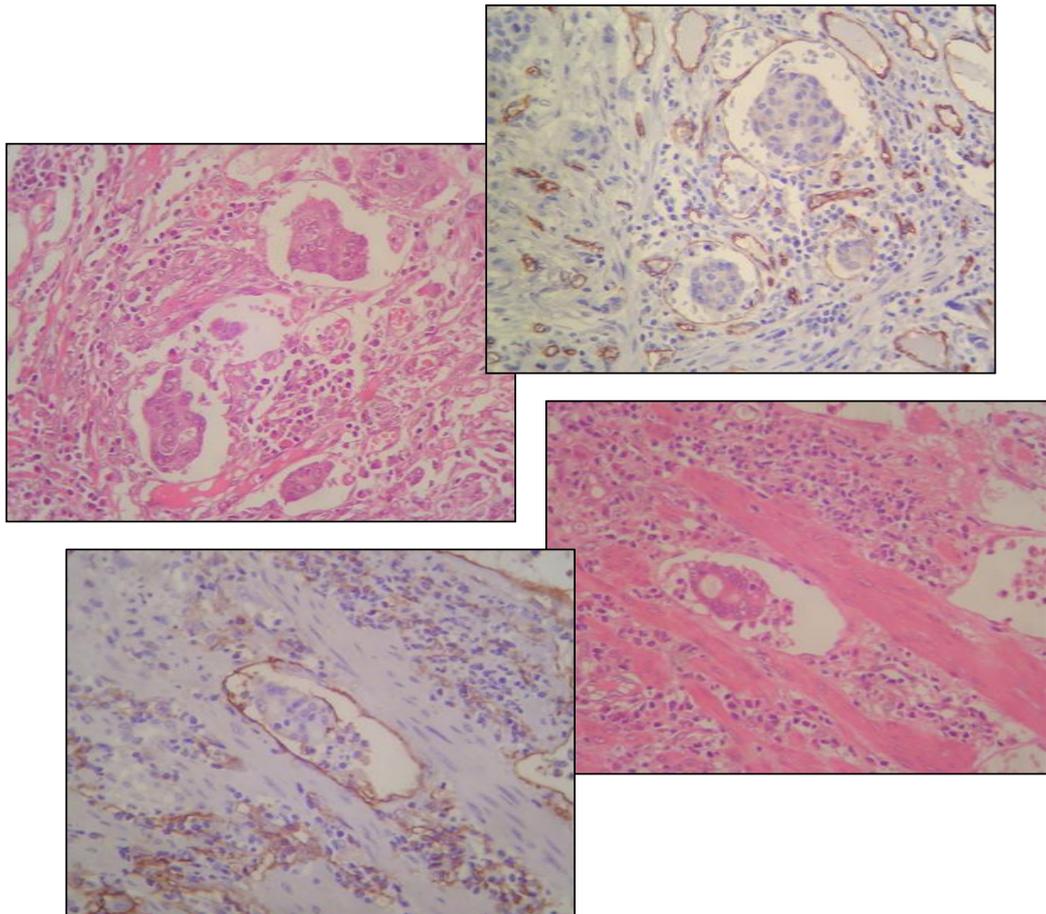


LETÍCIA TRIVELLATO GRESTA

**Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico:  
correlação de marcadores imuno-histoquímicos e  
densidade microvascular com os dados clínico-  
patológicos dos pacientes**



Belo Horizonte

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal**

Programa de Pós-Graduação em Patologia:  
Defesa de Doutorado – Área de Concentração em Patologia Médica

**Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico:  
correlação de marcadores imuno-histoquímicos e  
densidade microvascular com os dados clínico-  
patológicos dos pacientes**

Letícia Trivellato Gresta

Belo Horizonte

2014

LETÍCIA TRIVELLATO GRESTA

**Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico:  
correlação de marcadores imuno-histoquímicos e  
densidade microvascular com os dados clínico-  
patológicos dos pacientes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia Médica

ORIENTADORA: Profa. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral

Belo Horizonte

2014

G832a Gresta, Leticia Trivellato.  
Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico [manuscrito]:  
correlação de marcadores imuno-histoquímicos e densidade microvascular  
com os dados clínico-patológicos dos pacientes. / Leticia Trivellato Gresta.  
- - Belo Horizonte: 2014.  
120f.: il.  
Orientadora: Mônica Maria Demas Álvares Cabral.  
Área de concentração: Patologia.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina.

1. Neoplasias Gástricas. 2. Estadiamento de Neoplasias. 3. Metástase  
Linfática. 4. Imunoistoquímica. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Cabral,  
Mônica Maria Demas Álvares. II. Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WI 320

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **REITOR**

Prof. Clélio Campolina Diniz

### **PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

### **PRÓ-REITOR DE PESQUISA**

Profa. Adelina Martha dos Reis

### **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Francisco José Penna

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

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

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

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

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

Prof. Wagner Luiz Tafuri

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

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Profa. Rosa Maria Esteves Arante

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Profa. Tatiane Alves da Paixão

Profa. Milene Alvarenga Rachid

Conrado de Oliveira Gamba (Discente Titular)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA LETICIA TRIVELLATO GRESTA

Realizou-se, no dia 24 de fevereiro de 2014, às 08:00 horas, INSTITUTO ALFA DE GASTROENTEROLOGIA, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico: correlação de marcadores imuno-histoquímicos e densidade microvascular com os dados clínico-patológicos dos pacientes*, apresentada por LETICIA TRIVELLATO GRESTA, número de registro 2010668388, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Monica Maria Demas Alvares Cabral - Orientador (UFMG), Prof(a). Alfredo José Afonso Barbosa (UFMG), Prof(a). Paulo Roberto Savassi Rocha (UFMG), Prof(a). Miriam Aparecida da Silva Trevisan (UNICAMP), Prof(a). Orlando Barreto Zocratto (UFOP).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2014.

Prof(a). Monica Maria Demas Alvares Cabral ( Doutora )

Prof(a). Alfredo José Afonso Barbosa ( Doutor )

Prof(a). Paulo Roberto Savassi Rocha ( Doutor )

Prof(a). Miriam Aparecida da Silva Trevisan ( Doutor )

Prof(a). Orlando Barreto Zocratto ( Doutor )

# Faculdade de Medicina da UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Centro de Pós-Graduação - CPG



## DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que **Leticia Trivellato Gresta**, em vinte e quatro de fevereiro de dois mil e quatorze, defendeu a tese de Doutorado intitulada: "Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico: correlação de marcadores imuno-histoquímicos e densidade microvascular com os dados clínico-patológicos dos pacientes", foi aprovada, obtendo o título de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 06 de novembro de 2014.

Danielle Godoi  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5º andar - Santa Efigênia  
CEP 30130100 - Belo Horizonte MG - Brasil

+55 (31) 3409-9640  
[www.medicina.ufmg.br](http://www.medicina.ufmg.br)

***Aos meus dois amores incondicionais,  
Ismael e Laura***

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu amor, pelo passado, presente e futuro que ainda teremos juntos.

À Profa. Mônica, pela amizade e confiança.

A todos os meus professores, alunos, colegas de profissão e de trabalho, amigos e familiares que tanto contribuíram e torceram para que este trabalho fosse concluído.

***“O que verdadeiramente somos é aquilo que o impossível cria em nós”***

Clarice Lispector

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** o câncer gástrico é a segunda maior causa de morte por câncer em todo o mundo, sendo o estadiamento TNM o fator mais importante para o prognóstico dos pacientes, especialmente a presença de metástases linfonodais. A invasão vascular linfática detectada no tumor primário se correlaciona com a ocorrência de metástases linfonodais e é também considerada fator prognóstico independente nos pacientes com câncer gástrico. A avaliação da angioinvasão realizada apenas pela coloração de rotina hematoxilina-eosina pode gerar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos. O estudo imuno-histoquímico utilizando marcadores específicos do endotélio vascular possibilita distinção da ocorrência de invasão. A quantificação dos fatores angiogênicos e linfangiogênicos tem sido explorada na tentativa de predizer o prognóstico de diversas neoplasias. No câncer gástrico, um parâmetro promissor é a densidade microvascular linfática e sanguínea. **OBJETIVOS:** um de nossos objetivos é analisar comparativamente a detecção de invasão vascular linfática e sanguínea, pela hematoxilina-eosina e pela imuno-histoquímica com marcação por D2-40 e CD34 em uma série de carcinomas gástricos e correlacioná-las com os demais fatores prognósticos. Outro objetivo é avaliar densidade microvascular linfática e sanguínea em três aumentos microscópicos por meio de três marcadores: CD34, CD105 e D2-40. **MATERIAL E MÉTODOS:** foi realizado estudo imuno-histoquímico em cortes seriados, em 95 casos consecutivos de CG para avaliar a presença de invasão vascular linfática e sanguínea. Para a determinação da densidade microvascular, foram selecionados 52 casos. Foram comparados os resultados de invasão vascular entre as análises pela imuno-histoquímica e hematoxilina-eosina. A densidade microvascular foi realizada em cada marcador através da contagem dos microvasos em três aumentos microscópicos diferentes (100x, 200x e 400x). **RESULTADOS:** a detecção de invasão vascular linfática foi consideravelmente maior que a sanguínea. Foram identificados oito casos de falso-positivo e 13 casos de falso-negativo para invasão linfática. Foram identificados 24 casos de falso-positivo e 10 casos de falso-negativo para invasão sanguínea. A concordância diagnóstica entre os métodos foi moderada para invasão linfática (Kappa=0,50) e baixa para invasão sanguínea (Kappa=0,20).

A correlação entre a presença de metástases linfonodais e a presença de IVL e IVS foi estatisticamente significativa, tanto na avaliação pela HE ( $p=0,001$ ,  $p=0,013$ ), quanto pela IHQ ( $p=0,001$ ,  $p=0,019$ ). Em relação à densidade microvascular, quando avaliamos no aumento de 100x, obtivemos um valor bem menor que em 200x que, por sua vez, foi menor que em 400x. Esse fato ocorreu de forma proporcional e semelhante nos três marcadores, sendo estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ). A densidade microvascular obtida para CD34 foi maior que pelo CD105. A densidade microvascular linfática obtida pelo D2-40 foi menor que pelo CD34 e pelo CD105.

**CONCLUSÃO:** nossos resultados mostram que a aplicação do método imuno-histoquímico utilizando dois marcadores endoteliais combinados é superior na detecção de invasão vascular no câncer gástrico, quando comparada à coloração de rotina. A presença de invasão vascular está associada a outros fatores de pior prognóstico nos tumores, como metástases linfonodais, estágio avançado da neoplasia, invasão de órgãos por continuidade e o tipo misto/não classificável de Laurén, refletindo provavelmente o seu potencial metastático e comportamento agressivo. A padronização da quantificação da densidade microvascular necessária para a comparação entre resultados e confirmação do seu valor prognóstico no CG e em diferentes tipos de neoplasias, uma vez que existem diferenças consideráveis em seu valor, quando são utilizados métodos com pequenas variações.

**Palavras-chave:** Câncer gástrico; Invasão vascular linfática e sanguínea; Densidade microvascular; Fatores prognósticos; Imuno-histoquímica; CD34; CD105; D2-40.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Worldwide, gastric cancer is the second largest cause of cancer-related death. The TNM staging system for gastric cancer is widely used and it provides important prognostic information, especially with regards to the lymph node status. The presence of lymphatic invasion (LVI) detected on the primary tumor is the strongest risk factor for lymph node metastasis and is known as an independent prognostic factor in patients with gastric cancer. Because the evaluation of LVI is subjective with conventional Hematoxylin and Eosin (H&E) staining, it can lead to inaccurate false-positive and false-negative results. D2-40 is a specific monoclonal antibody for the lymphatic endothelium, being useful to identify LVI and distinguish lymphatic from blood vessel invasion (BVI) by neoplastic cells. **AIMS:** The aim of this study is to evaluate and compare LVI and BVI detected by H&E and immunohistochemistry (IHC) in a series of GC, relating them to morphologic features of the primary tumor and to the presence of lymph node metastasis. **METHODS:** IHC using D2-40 (lymphatic endothelial marker) and CD34 (pan-endothelial marker) was performed to study LVI and BVI in surgical specimens of a consecutive series of 95 primary GC. The results of the IHC study were compared with the detection of LVI and BVI by H&E, and related to other prognostic factors. The morphologic features of tumors and the presence of LVI and BVI were also related to the presence of lymph node metastasis. **RESULTS:** The detection of LVI was considerably higher than BVI. Sixty-one cases (64,2%) were positive for LVI when evaluated by H&E, whether 66 (69,5%) were detected by IHC. From the 61 cases with LVI by H&E, 8 were false-positives by IHC. The IHC detected LVI in 13 cases that were negative by H&E. BVI was identified in 38 cases (40,0%) by H&E and in just 24 (25,2%) by IHC. The IHC study identified 24 cases of false-positives and 10 cases of false-negatives for BVI. The comparison of LVI detected by both methods was not statistically significant. There was a significant difference between BVI detected by H&E and IHC ( $p=0,02$ ). The average Kappa value determined for LVI was moderate (Kappa=0,50) and low for BVI (Kappa=0,20). The correlation between lymph node metastasis and the presence of LVI and BVI was statistically significant when evaluated by H&E ( $p=0,001$ ,  $p=0,013$ ), and IHC ( $p=0,001$ ,  $p=0,019$ ). The presence of lymph node metastasis was associated with the depth of tumor invasion when compared

advanced to early GC ( $p=0,001$ ), mixed-type of Laurén's classification when compared to the diffuse-type ( $p=0,017$ ) and organ invasion (esophagus and duodenum) ( $p=0,026$ ). The morphologic features associated with LVI were: location of tumor at distal third of the stomach ( $p=0,039$ ), Borrmann's macroscopic type ( $p=0,001$ ), organ invasion ( $p=0,003$ ) and depth of tumor invasion ( $p=0,001$ ). The presence of BVI is related only to the depth of tumor invasion ( $p=0,003$ ).

**CONCLUSION:** LVI was more easily identified in the D2-40 immunostained sections than in the H&E stained sections. The presence of LVI and BVI is associated with the presence of lymph node metastasis. The presence of LVI is associated to others morphological features of poor prognosis, as advanced stage of disease, mixed-type of Laurén's classification when compared to the diffuse-type and organ invasion (esophagus and duodenum), probably reflecting a potential for lymphatic metastatic spread and aggressive behavior. Our results show that the IHC method with these two markers is superior to the conventional H&E staining for detecting LVI and BVI in GC. Immunohistochemical identification of lymphatic and blood vessels in GC is useful to increase the accuracy of diagnosing the presence lymph or blood vessel invasion and to predict lymph node metastasis.

**Key-words:** Gastric cancer; Lymphatic and Blood vessel invasion; Microvascular density; predictive factors; Immunohistochemistry; CD34; CD105; D2-40.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	Características clínico-patológicas da amostra (N=95).....	59
<b>TABELA 2.</b>	Revisão histopatológica dos casos de carcinoma gástrico (N=95).....	61
<b>TABELA 3.</b>	Comparação entre a classificação histológica de Laurén e a profundidade tumoral em 95 casos de carcinoma gástrico (N=95).....	63
<b>TABELA 4.</b>	Avaliação da invasão vascular linfática pelos métodos de HE e IHQ (N=95).....	66
<b>TABELA 5.</b>	Avaliação da invasão vascular sanguínea pelos métodos de HE e IHQ (N=95).....	66
<b>TABELA 6.</b>	Comparação entre a concordância diagnóstica na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela HE e pela IHQ (N=95).....	67
<b>TABELA 7.</b>	Comparação entre a detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela HE e IHQ e a presença de metástases linfonodais (N=89).....	69
<b>TABELA 8.</b>	Associação entre parâmetros clínico-patológicos e as presenças de invasão vascular linfática e sanguínea pela IHQ (N=95).....	70
<b>TABELA 9.</b>	Características clínico-patológicas da amostra (N=52).....	72
<b>TABELA 10.</b>	Número médio de microvasos contados em três campos microscópicos de 52 casos analisados.....	75
<b>TABELA 11.</b>	Valores de densidade microvascular de 52 casos analisados.....	77
<b>TABELA 12.</b>	Análise de variância entre as médias dos valores de DMV encontrados em cada aumento microscópico (N=52).....	80
<b>TABELA 13.</b>	Associação entre os parâmetros clínico-patológicos e DMV obtida em três aumentos microscópicos com CD34 (N=52).....	83
<b>TABELA 14.</b>	Associação entre os parâmetros clínico-patológicos e DMV obtida em três aumentos microscópicos com D2-40 (N=52).....	84
<b>TABELA 15.</b>	Associação entre os parâmetros clínico-patológicos e DMV obtida em três aumentos microscópicos com CD105 (N=52).....	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Classificação histológica do CG segundo Laurén. <b>A:</b> CG do tipo intestinal. <b>B:</b> CG do tipo difuso. <b>C:</b> CG do tipo não-classificável.....	23
<b>FIGURA 2.</b>	Classificação macroscópica do carcinoma gástrico precoce segundo a Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva. Tipos: protuso (polipóide), superficial (elevado, plano e deprimido) e ulcerado (escavado).....	25
<b>FIGURA 3.</b>	Classificação macroscópica do carcinoma gástrico avançado segundo Borrmann. Tipos: polipóide (vegetante), ulcerado expansivo (fungado), úlcero-infiltrativo (ulcerado) e infiltrativo (difuso).....	26
<b>FIGURA 4.</b>	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago) .....	27
<b>FIGURA 5.</b>	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago) .....	28
<b>FIGURA 6.</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não-melanoma.....	28
<b>FIGURA 7.</b>	Diagrama esquemático ilustrando os possíveis fatores preditivos de metástases linfonodais, no qual se destacam os linfáticos intra e peritumorais e a linfangiogênese .....	42
<b>FIGURA 8.</b>	Densidade vascular linfática nas diferentes camadas da parede gástrica normal. Média $\pm$ DP de 30 pontos (por milímetro quadrado). M: mucosa; MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; MP: muscular própria; SS: subserosa .....	46
<b>FIGURA 9.</b>	Mapa de Clivagem para o processamento das peças cirúrgicas de carcinoma gástrico: amostragem para exame histológico .....	49
<b>FIGURA 10.</b>	Exemplo de caso com contagem microvascular em cada um dos marcadores utilizando o aumento microscópico de 20x.....	54
<b>FIGURA 11.</b>	Esquema ilustrativo do método utilizado para contagem vascular aplicado em um caso da amostra.....	55
<b>FIGURA 12.</b>	Fotomicrografias de lâmina milimetrada para medida e cálculo da área do campo microscópico.....	57

<b>FIGURA 13.</b>	Fotomicrografias dos cortes seriados de invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela HE (seta) e IHQ. <b>A:</b> IVL HE (x400). <b>B:</b> IVL marcação por CD34 (x400). <b>C:</b> IVL marcação por D2-40 (x400). <b>D:</b> IVS HE (x100). <b>E:</b> IVS HE (x400). <b>F:</b> IVS marcação por CD34 (x400). <b>G:</b> IVS HE (x200). <b>H:</b> IVS marcação por CD34 (x200) <b>I:</b> IVS marcação por D2-40 (x200) .....	64
<b>FIGURA 14.</b>	Fotomicrografias de cortes seriados de invasão vascular linfática detectada apenas pela IHQ e de falsa invasão vascular linfática e/ou sanguínea diagnosticada ao HE. <b>A e B:</b> IVL marcação por D2-40 (x400); <b>C:</b> falsa IVL HE (x100); <b>D:</b> falsa IVL marcação por D2-40 (x100).....	65
<b>FIGURA 15.</b>	Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular linfática em 95 casos de CG.....	68
<b>FIGURA 16.</b>	Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular sanguínea em 95 casos de CG.....	68
<b>FIGURA 17.</b>	Exemplo de caso com contagem microvascular em cada um dos aumentos utilizando o marcador CD34.....	74
<b>FIGURA 18.</b>	Comparação entre os campos microscópicos dos aumentos estudados e suas respectivas áreas e contagens microvasculares (coloração IHQ pelo CD34).....	79
<b>FIGURA 19.</b>	Histogramas representando o padrão de distribuição da densidade microvascular nos três aumentos estudados (100x, 200x, 400x) pelos três marcadores imuno-histoquímicos (CD34, D2-40, CD105). <b>A.</b> DMV CD34.100x. <b>B.</b> DMV CD34.200x. <b>C.</b> DMV CD34.400x. <b>D.</b> DMV D2-40.100x. <b>E.</b> DMV D2-40.200x. <b>F.</b> DMV D2-40.400x. <b>G.</b> DMV CD105.100x. <b>H.</b> DMV CD105.200x. <b>I.</b> DMV CD105.400x.....	81

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1.</b>	Correlação entre faixa de idade dos pacientes e tipo de carcinoma gástrico, segundo a classificação histológica de Laurén.....	62
<b>GRÁFICO 2.</b>	Variação da DMV média dos 52 casos conforme o aumento microscópico estudado e os marcadores IHQ.....	78

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1.</b>	Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico .....	51
<b>QUADRO 2.</b>	Resultados dos coeficientes de concordância de Kappa de acordo com a classificação de Landis & Koch.....	56
<b>QUADRO 3.</b>	Área dos campos microscópicos obtida para cada aumento microscópico (100x, 200x, 400x).....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

APM – Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG

BVI – *blood vessel invasion*

cagA – Proteína produzida pelo *H. pylori* “*cytotoxin-associated gene A*”

CG – Carcinoma gástrico

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

COX-2 – Enzima pró-inflamatória ciclooxigenase-2

DAB – Diaminobenzidina

DMV – Densidade microvascular

DMVL – Densidade microvascular linfática

DMVS – Densidade microvascular sanguínea

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ou Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

GC – *gastric carcinoma*

HC – Hospital das Clínicas

HE – Hematoxilina e eosina

H&E – *Hematoxylin and Eosin staining*

IHC – *Immunohistochemistry*

IHQ – Imuno-histoquímica ou imuno-histoquímico

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional de Câncer

iNOS – Enzima pró-inflamatória óxido-nítrico sintetase

IVL – Invasão vascular linfática por células neoplásicas

IVS – Invasão vascular sanguínea por células neoplásicas

JGCA – *Japanese Gastric Cancer Association*

LP-TGI – Laboratório de Pesquisa em Patologia do Trato Gastrointestinal

LTG – Letícia Trivellato Gresta

LSAB - *Labeled Streptavidin-Biotin*, ou Estreptavidina-Biotina Peroxidase

LVI – *lymph vessel invasion*

µm – Micrômetros

mm – milímetros

mm<sup>2</sup> – milímetros quadrados

MMDAC – Mônica Maria Demas Álvares Cabral  
NC – Não classificável segundo Lurn  
NIH – National Institutes of Health  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PBS – Solução tampão salino-fosfatado  
pM – Avaliação patológica de metástases hematogênicas segundo o TNM  
pN – Avaliação patológica de metástases linfonodais segundo o TNM  
pT – Avaliação patológica da profundidade de invasão tumoral segundo o TNM  
SBP – Sociedade Brasileira de Patologia  
SJED – Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva  
SOE – Sem outra especificação  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral-alfa  
TNM – Sistema de classificação de neoplasias para estadiamento  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UICC – *Union Internationale Contre le Cancer*  
VEGF – Fator de crescimento derivado do endotélio vascular  
VEGF-C – Fator de crescimento C derivado do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 Justificativa</b> .....	19
<b>1.2 Objetivos</b> .....	21
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	22
<b>2.1 Aspectos clínico-patológicos do carcinoma gástrico</b> .....	22
2.1.1 <i>Classificação histológica do carcinoma gástrico</i> .....	22
2.1.2 <i>Avaliação macroscópica do carcinoma gástrico</i> .....	24
2.1.3 <i>Fatores epidemiológicos relacionados ao carcinoma gástrico</i> .....	26
2.1.4 <i>Fatores etiológicos relacionados ao carcinoma gástrico</i> .....	29
2.1.5 <i>Aspectos gerais relacionados à carcinogênese gástrica</i> .....	31
<b>2.2 Aspectos prognósticos clássicos do carcinoma gástrico</b> .....	33
2.2.1 <i>Tipo histológico e prognóstico do câncer gástrico</i> .....	33
2.2.2 <i>Importância do estadiamento anatomopatológico no carcinoma gástrico</i> ...	34
2.2.3 <i>Papel do rastreamento endoscópico no diagnóstico do carcinoma gástrico</i>	37
<b>2.3 Novos parâmetros prognósticos na avaliação do carcinoma gástrico</b>	39
2.3.1 <i>Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea</i> .....	39
2.3.2 <i>Neoformação vascular linfática e sanguínea na carcinogênese gástrica</i> .....	40
<b>2.4 Métodos de avaliação de angiogênese e linfangiogênese</b> .....	43
2.4.1 <i>Determinação da densidade microvascular</i> .....	43
2.4.2 <i>Marcadores imuno-histoquímicos para contagem vascular</i> .....	44
2.4.3 <i>Importância da avaliação da densidade microvascular linfática no câncer gástrico</i> .....	46
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3.1 Seleção dos casos</b> .....	48
<b>3.2 Estudo morfológico dos tumores primários</b> .....	50
<b>3.3 Estudo imuno-histoquímico</b> .....	50
<b>3.4 Avaliação de invasão vascular</b> .....	52
3.4.1 <i>Avaliação de invasão vascular pela coloração de HE</i> .....	52

3.4.2 Avaliação de invasão vascular pela coloração de IHQ .....	52
<b>3.4 Determinação da densidade microvascular.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5 Análise estatística .....</b>	<b>56</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Características gerais da amostra .....</b>	<b>58</b>
4.1.1 Características clínico-patológicas dos casos .....	58
4.1.2 Revisão histopatológica .....	60
4.1.3 Comparação entre as variáveis clínico-patológicas idade e profundidade tumoral com a classificação histológica de Laurén .....	61
<b>4.2 Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea .....</b>	<b>63</b>
4.2.1 Invasão vascular linfática e invasão vascular sanguínea .....	63
4.2.2 Comparação da eficácia dos métodos de HE e IHQ na identificação de invasão vascular .....	66
4.2.3 Comparação entre invasão vascular e metástases linfonodais .....	68
4.2.4 Associação entre variáveis clínico-patológicas e invasão vascular.....	69
<b>4.3 Avaliação da densidade microvascular linfática e sanguínea.....</b>	<b>72</b>
4.3.1 Contagem microvascular.....	73
4.3.2 Densidade microvascular sanguínea e linfática.....	76
4.3.3 Análise das diferenças entre os valores de densidade microvascular obtidos nos três aumentos microscópicos .....	79
4.3.4 Associação entre fatores prognósticos para o câncer gástrico e densidade microvascular sanguínea e linfática .....	82
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>113</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa

A incidência do carcinoma gástrico (CG) tem exibido tendência global de declínio nos últimos decênios. Entretanto, ainda figura como a quarta neoplasia mais frequente e a segunda maior causa de morte por câncer em todo o mundo. As estimativas brasileiras produzidas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para 2014 não são diferentes. O número de casos novos de câncer de estômago estimados no Brasil para o ano de 2014 é de 12.870 para a população masculina e 7.520 para a feminina. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e de 7 a cada 100 mil mulheres.

A razão mortalidade/incidência do CG é consideravelmente alta em todas as partes do mundo, sendo a sobrevida relativa em cinco anos baixa, cerca de 20% na maioria dos países em desenvolvimento. Apesar dos valores ainda elevados de mortalidade, há tendência de melhoria das taxas de sobrevida com os avanços da endoscopia digestiva e conseqüente detecção de tumores cada vez mais precoces. Entretanto, observações epidemiológicas realizadas no Brasil permitem afirmar que essas tendências de melhoria são menos pronunciadas em nosso meio, onde os diagnósticos são em geral tardios. Portanto, são justificados todos os esforços na tentativa de aproximar o perfil brasileiro ao dos países mais desenvolvidos em relação ao diagnóstico e tratamento desta neoplasia.

Apesar da notável agressividade dessa neoplasia em fases avançadas, devemos ter em mente que minimizar a quantidade de procedimentos invasivos é essencial para melhorar a qualidade de vida do paciente. Por outro lado, a

abordagem cirúrgica com fins curativos, envolvendo gastrectomia com linfadenectomia, é considerada a única intervenção capaz de prolongar a sobrevida. Alguns tratamentos mais conservadores, como a ressecção endoscópica ou mucosectomia sem esvaziamento linfonodal, podem ser aplicados em casos altamente selecionados de CG precoce. Para que se possa prescindir da linfadenectomia nesses casos, é necessária a avaliação adequada do potencial metastático de cada neoplasia individualmente. Atualmente, a profundidade da invasão tumoral (pT), a presença de metástases linfonodais (pN) ou à distância (pM) são considerados os fatores prognósticos mais importantes para o CG. Entretanto, procuram-se indicadores moleculares mais sensíveis, capazes de prever a evolução e o comportamento biológico desses tumores.

A formação de novos vasos sanguíneos ou angiogênese ocorre em diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo de fundamental importância na progressão tumoral. Além de preceder o crescimento tumoral, a angiogênese é imprescindível para a ocorrência de metástases. As células neoplásicas invadem os vasos neoformados e são transportadas a outros sítios no organismo produzindo metástases. A linfangiogênese, ou seja, a formação de novos vasos linfáticos também é fator de risco para metástases linfonodais. Apesar de haver numerosos trabalhos envolvendo angiogênese, são poucos os estudos que avaliam a linfangiogênese como fator prognóstico nas neoplasias.

Por todas essas razões, a avaliação adequada dos prováveis fatores determinantes do potencial metastático da neoplasia é um dos aspectos mais relevantes para a abordagem terapêutica do CG e, conseqüentemente, para a sobrevida dos pacientes.

## 1.2 Objetivos

- ✓ Analisar comparativamente a eficácia da detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pelo método de coloração de rotina pela hematoxilina-eosina e após a marcação imuno-histoquímica em uma série de casos de CG;
- ✓ Avaliar a presença de invasão vascular linfática e sanguínea e sua relação com a presença de metástases linfonodais e com características clínico-patológicas dos pacientes;
- ✓ Avaliar a angiogênese por meio da contagem vascular com marcação imuno-histoquímica pelo CD34 e pelo CD105, em três aumentos microscópicos diferentes.
- ✓ Avaliar a linfangiogênese por meio da contagem vascular com marcação imuno-histoquímica pelo D2-40, em três aumentos microscópicos diferentes.
- ✓ Calcular o valor da densidade microvascular de vasos sanguíneos e linfáticos para cada um dos marcadores em estudo e compará-los entre si.
- ✓ Verificar existência de associação entre densidade microvascular e características clínico-patológicas de significado prognóstico, como subtipos histológicos do tumor, profundidade de invasão, presença de metástases linfonodais e de invasão vascular linfática e sanguínea.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aspectos clínico-patológicos do carcinoma gástrico

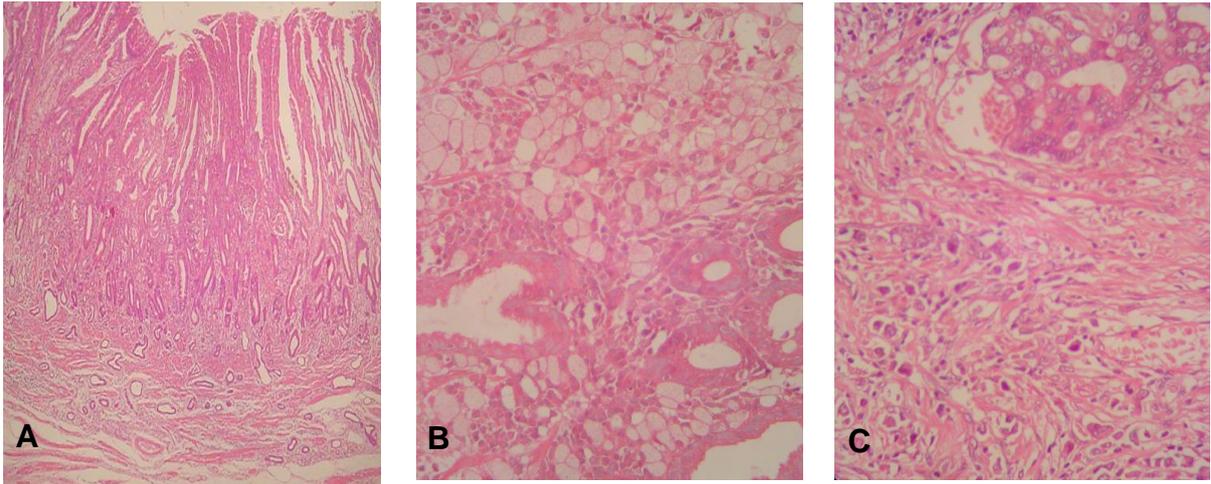
O CG representa mais de 90% das neoplasias malignas do estômago e compreende um grupo bastante heterogêneo de neoplasias do ponto de vista morfológico (1, 2). Essa heterogeneidade pode ser demonstrada pelos diversos sistemas de classificação desenvolvidos para caracterizar o CG, que são baseados em diferentes abordagens: tipo histológico, padrão macroscópico, topografia, padrão de crescimento, grau histológico de diferenciação ou histogênese da neoplasia.

#### 2.1.1 *Classificação histológica do carcinoma gástrico*

O CG é uma neoplasia maligna epitelial da mucosa gástrica, de origem glandular (3). É constituída, em sua maioria, por estruturas tubulares, acinares e papilares, ou então consiste em complexa combinação de células isoladas e pouco coesas, com estruturas glandulares, trabeculares ou sólidas. Diversos sistemas de classificação foram propostos para o CG, porém os mais utilizados são as classificações histológicas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e de Laurén (3, 4). Ambos baseiam-se nos aspectos morfológicos característicos das biópsias e peças cirúrgicas de CG, identificados apenas ao exame histopatológico.

Segundo Laurén (4), as neoplasias podem ser classificadas em dois tipos principais: intestinal e difuso. O CG do tipo intestinal forma glândulas claramente identificáveis, cuja diferenciação varia de pouco a bem diferenciadas. O tipo difuso consiste na proliferação de células isoladas, com tendência a acúmulo de muco

intracelular, que infiltram a parede gástrica individualmente, sem formação glandular. Tumores que contêm proporções variáveis destes tipos são chamados mistos, e aqueles que não se encaixam em nenhuma categoria são os não-classificáveis (NC) segundo Laurén (FIG.1).



**FIGURA 1:** Classificação histológica do CG segundo Laurén. **A:** CG do tipo intestinal. **B:** CG do tipo difuso. **C:** CG do tipo não-classificável.  
**FONTE:** Fotomicrografias do arquivo pessoal.

A classificação de Laurén é amplamente utilizada, pois indica a história natural do CG, mostrando associação epidemiológica com a faixa etária de incidência e fatores prognósticos e etiopatogênicos (4, 5).

A classificação da OMS baseia-se no padrão histológico arquitetural predominante da neoplasia. Os principais tipos são: adenocarcinoma tubular, papilar, mucinoso, adenocarcinoma sem outra especificação (SOE) e carcinoma de células em anel de sinete (3). Esta classificação é basicamente descritiva, não refletindo o comportamento biológico da neoplasia (6).

Outra classificação morfológica simples foi proposta por Ming, baseada no padrão de crescimento da neoplasia (7). Ela divide o CG em dois tipos, de acordo

com a capacidade de infiltrar a parede gástrica. O tipo expansivo corresponde a dois terços dos tumores, exibindo massas circunscritas de células neoplásicas coesas, com bordas claramente demarcadas. Os tumores do tipo infiltrativo são caracterizados pela infiltração difusa da parede por células neoplásicas individuais, estando presente no terço restante das neoplasias gástricas. A diferenciação entre os dois padrões de crescimento da neoplasia tem relevância prognóstica, apresentando relação estatisticamente significativa com o estadiamento TNM, segundo estudos prospectivos (8).

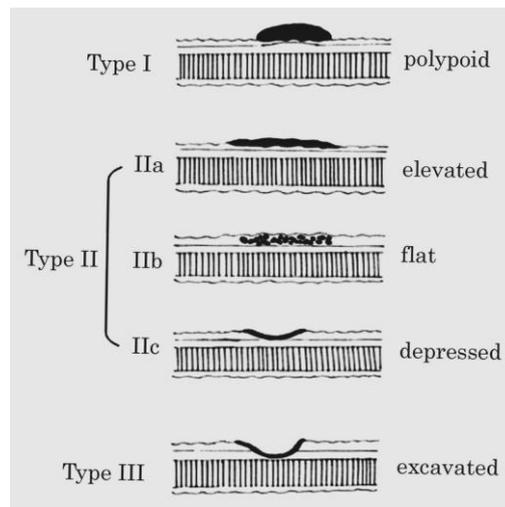
### *2.1.2 Avaliação macroscópica do carcinoma gástrico*

A avaliação macroscópica do CG consiste em determinar as dimensões do tumor e outras características, que podem ter implicação no prognóstico dos pacientes, destacando-se: a localização, o tipo de apresentação macroscópica e a distância entre o tumor e as margens cirúrgicas (9, 10).

A localização mais frequente do CG é na pequena curvatura antral do terço distal do estômago (3). Entretanto, os tumores localizados no terço proximal do estômago, particularmente as neoplasias da cárdia, têm apresentado crescente incidência e prognóstico pior que os do terço distal ou médio (11).

A classificação macroscópica do CG precoce é fortemente relacionada aos critérios utilizados para a classificação endoscópica da Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva (SJED) (12). Ela apresenta três categorias distintas, que podem estar combinadas em alguns tumores (FIG.2). O tipo I, chamado protruso, identifica tumores que formam proeminência na mucosa gástrica, com morfologia polipoide. O tipo II, ou superficial, pode ser subdividido em três variantes:

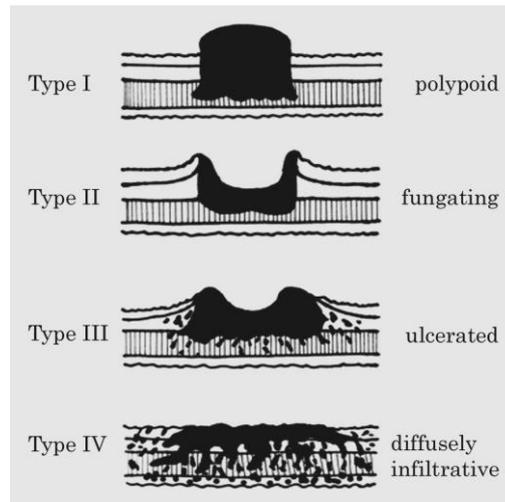
superficialmente elevado (IIa), plano (IIb) ou deprimido (IIc). Por fim, o tipo III é o ulcerado, similar à úlcera gástrica de origem péptica, sendo o tipo macroscópico mais frequente dentre os CG precoces (13).



**FIGURA 2:** Classificação macroscópica do carcinoma gástrico precoce segundo a Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva. Tipos: protruso (polipoide), superficial (elevado, plano e deprimido) e ulcerado (escavado).

**FONTE:** Japanese Classification of Gastric Carcinoma (1998).

O CG avançado pode ser classificado em quatro padrões de apresentação macroscópica (14). O tipo I, chamado polipoide ou vegetante, é geralmente associado aos carcinomas bem diferenciados. O tipo II, denominado ulcerado expansivo, mostra bordas elevadas com ulceração rasa central. O tipo III é o úlcero-infiltrativo, enquanto o tipo IV mostra padrão infiltrativo difuso na parede gástrica, denominado linite plástica (FIG.3).



**FIGURA 3:** Classificação macroscópica do carcinoma gástrico avançado segundo Borrmann. Tipos: polipóide (vegetante), ulcerado expansivo (fungado), úlcero-infiltrativo (ulcerado) e infiltrativo (difuso).

**FONTE:** Borrmann Classification of Advanced Gastric Cancer (1926).

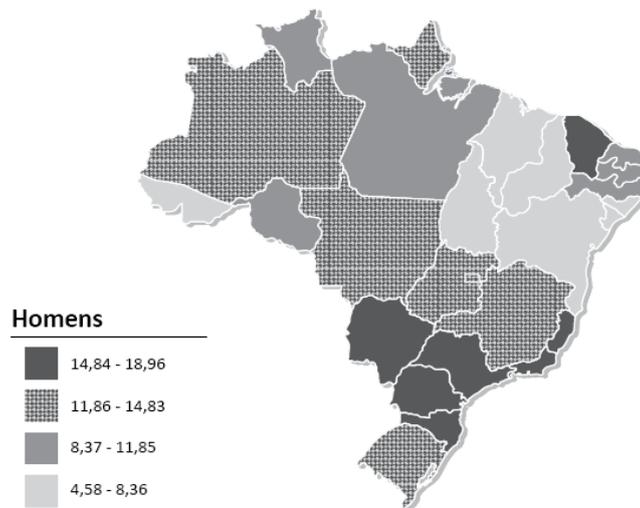
### 2.1.3 Fatores epidemiológicos relacionados ao carcinoma gástrico

No mundo, as altas taxas de incidência do CG configuram-no como o quarto tipo mais comum de neoplasia e, em termos de mortalidade, como a segunda causa de óbitos por câncer (15, 16). Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento, sendo maior no sexo masculino que no feminino (3).

A distribuição geográfica mundial dessa doença exhibe variações extremas, com áreas de alto risco que incluem os países orientais da Ásia, como Japão, China e Coreia; Europa Oriental; além de países da América Central e do Sul. A população dos países do sudeste asiático, da África, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia é considerada de baixo risco para desenvolvimento do CG (17). Nos últimos 50 anos, a incidência do CG vem sofrendo queda gradual e contínua devido, particularmente, às melhorias na dieta, como o aumento da disponibilidade de frutas

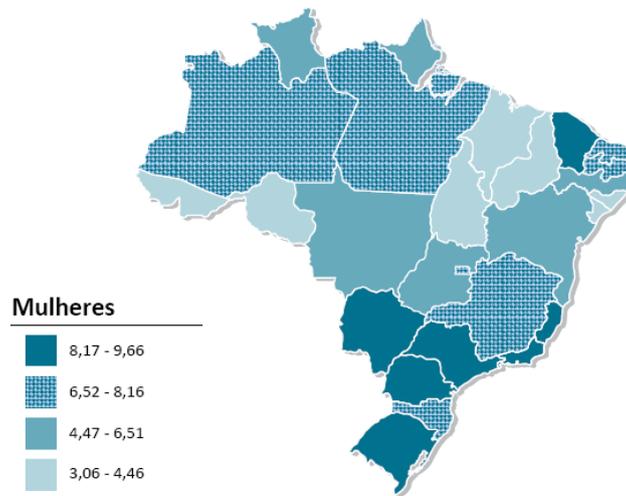
e vegetais e a diminuição no consumo de sal, aliada a sua não utilização para a preservação dos alimentos (3) (18).

No Brasil, estudos epidemiológicos revelam que a distribuição estimada dos casos novos de CG mostra-se também heterogênea entre os diferentes estados e regiões do país (19). O câncer de estômago em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Norte e Nordeste e o quarto nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (FIG.4). Em relação às mulheres, é o quarto mais freqüente na Região Norte, o quinto na região Centro-Oeste e, nas demais regiões, Sul, Sudeste e Nordeste, é o sexto mais incidente (FIG.5).



**FIGURA 4:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago).

**FONTE:** Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS, Brasil.



**FIGURA 5:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago).

**FONTE:** Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS, Brasil.

O número de casos novos de câncer de estômago estimado para o Brasil no ano de 2012 foi de 12.670 para a população masculina e 7.420 para a feminina (FIG.6). Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos para cada 100 mil homens e 7 para cada 100 mil mulheres (19).

Homens				Mulheres			
Localização primária	casos novos	percentual		Localização primária	casos novos	percentual	
Próstata	60.180	30,8%		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 Tireoide	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%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%	

**FIGURA 6:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não-melanoma.

**FONTE:** Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS, Brasil.

A classificação histológica de Laurén guarda relação com a faixa etária de incidência e com diversos aspectos epidemiológicos do CG, inclusive com a distribuição geográfica na população mundial (6, 15). O tipo intestinal predomina nas populações de alto risco para CG e nos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, a redução da prevalência desse tipo específico de CG foi a responsável pela queda das taxas de mortalidade por essa neoplasia observada nos últimos decênios (17). Pacientes do sexo masculino são mais acometidos, numa média de idade em torno de 60 anos. O tipo difuso é relativamente mais frequente nas populações de baixo risco, acomete igualmente ambos os sexos, com idade média em torno de 50 anos, apresentando pior prognóstico. Não houve modificação significativa em sua prevalência nos últimos decênios (20).

A razão mortalidade/incidência do CG é consideravelmente alta em todas as partes do mundo, sendo a sobrevida relativa em cinco anos baixa, cerca de 20% na maioria dos países em desenvolvimento (21). Apesar dos valores ainda elevados de mortalidade, há tendência de melhoria das taxas de sobrevida com os avanços da endoscopia digestiva e, conseqüentemente, na detecção de tumores cada vez mais precoces (17).

#### *2.1.4 Fatores etiológicos relacionados ao carcinoma gástrico*

A origem do CG é multifatorial, atribuída predominantemente a fatores ambientais, desenvolvendo-se a partir de interações complexas entre fatores genéticos e modulação da resposta imunológica do hospedeiro, comumente após longo período de gastrite atrófica (15). Estudos epidemiológicos em diferentes populações demonstram relação expressiva com a dieta, especialmente em relação

aos carcinomas de tipo intestinal. Entretanto a associação mais importante se dá com a infecção por *Helicobacter pylori*, adquirida comumente na infância (18).

A forte associação entre a dieta rica em sal e o risco aumentado para CG e suas condições e lesões precursoras está bem estabelecida desde as décadas de 1970 e 1980 (22, 23). Os efeitos da dieta excessivamente rica em sal estão associados a alterações inflamatórias e reparativas, com conseqüente indução de atrofia na mucosa gástrica (24). O sal em excesso pode também contribuir para aumentar a capacidade mutagênica de alimentos ricos em nitrosaminas (22). Nitrosaminas são compostos com potencial cancerígeno, provenientes da transformação de nitratos e nitritos, presentes em alguns alimentos e na saliva, dentro do ambiente gástrico (25). Fatores de risco comuns a outros tumores, como consumo de álcool, tabaco e exposição ocupacional a nitrosaminas e agentes inorgânicos tem sido estudados em diversas populações, porém com resultados inconsistentes em relação ao CG (3).

O *H. pylori* é uma bactéria espiralada Gram-negativa com capacidade de colonizar e de se estabelecer permanentemente no adverso meio-ambiente do estômago humano, causando infecção crônica em grande parte da população mundial (26, 27). Atualmente está bem estabelecido que a infecção crônica da mucosa gástrica por *H. pylori* é o principal fator causal de doenças como a gastrite crônica e a úlcera péptica, além de estar implicada na patogênese da atrofia e da metaplasia intestinal, condições consideradas de risco para o desenvolvimento do CG (28-30).

Fatores de virulência próprios da bactéria, como a expressão do gene *cagA* (cytotoxin-associated gene A), também interferem na relação parasito-hospedeiro,

estimulando a ativação do processo inflamatório no sentido da carcinogênese (31, 32).

#### 2.1.5 Aspectos gerais relacionados à carcinogênese gástrica

Dentre os diversos modelos propostos para a carcinogênese gástrica, destaca-se o de Pelayo Correa (24). Neste modelo, o CG do tipo intestinal surgiria a partir de uma sucessão de eventos que se iniciaria pela infecção crônica da mucosa gástrica pelo *Helicobacter pylori* (33). Este processo engloba os seguintes eventos seqüenciais para o seu desenvolvimento: gastrite crônica, atrofia multifocal, metaplasia intestinal e displasia de baixo e alto graus (neoplasia intra-epitelial) (18). Em contrapartida, o CG tipo difuso de Laurén não mostra relação sequencial tão significativa com os fatores ambientais, estando predominantemente associado a fatores genéticos (34, 35).

Nesta sequencia, o *H. pylori* atuaria em diversas etapas do processo da carcinogênese gástrica, gerando estímulo contínuo à inflamação, à proliferação celular e às alterações gênicas (36). Entretanto, o mecanismo de lesão inicial ao DNA das células da mucosa gástrica permanece ainda desconhecido. A hipótese mais difundida atualmente na literatura atribui o início do processo de carcinogênese ao estresse oxidativo induzido no epitélio gástrico pela infecção crônica (37). Essas alterações são iniciadas e sustentadas pela infecção persistente por *H. pylori*. A erradicação da bactéria, quando realizada precocemente, pode ser suficiente para interferir na cascata da carcinogênese e prevenir o surgimento da neoplasia (33).

O *H. pylori* apresenta entre suas amostras grande diversidade genética que amplia suas possibilidades de adaptação ao hospedeiro (38). Na grande maioria da

população infectada, prevalece o estado de equilíbrio entre os fatores de agressão da bactéria e de defesa do hospedeiro (28, 30). As amostras de *H. pylori* que expressam o gene *cagA* (cytotoxin-associated gene A) produzem a proteína *cagA*, altamente antigênica, que estimula resposta inflamatória acentuada da mucosa. Essa proteína induz maior produção e liberação de radicais livres de oxigênio e de enzimas pró-inflamatórias como ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido-nítrico sintetase (iNOS), do fator de necrose tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) e de interleucinas (IL) que atuam como potentes fatores quimiotáticos e ativadores de macrófagos e neutrófilos (37). Além do mais, as amostras *cagA*-positivas são as mais comumente observadas no CG (28, 31).

Estudos sobre a infecção crônica da mucosa gástrica por *H. pylori* e sua relação com a carcinogênese gástrica, conduzidos por nosso grupo de pesquisa, confirmaram observações prévias de que a infecção por amostras *cagA*-positivas está associada às condições pré-cancerosas, como atrofia e metaplasia intestinal (39). Estudos topográficos da mucosa gástrica realizados pelo mesmo grupo demonstraram que a proliferação epitelial e a expressão de proteínas pró-apoptóticas são significativamente mais intensas na pequena curvatura antral, onde surge a maioria dos CG (32, 39).

## 2.2 Aspectos prognósticos clássicos do carcinoma gástrico

### 2.2.1 Tipo histológico e prognóstico do câncer gástrico

Idealmente, um sistema de classificação histológica deve ser capaz de identificar aqueles tipos tumorais que apresentam características consideradas úteis na prevenção, no diagnóstico precoce e na terapêutica dos pacientes.

A classificação da OMS tem pouco valor prognóstico no CG e, conseqüentemente, relativa relevância clínica, uma vez que não leva em consideração dados epidemiológicos ou características histogenéticas da neoplasia (6). A maior vantagem da classificação da OMS é o reconhecimento dos padrões morfológicos que também são demonstrados em tumores de outras localizações, como intestino delgado e grosso, produzindo uma única abordagem histológica dos carcinomas do trato gastrointestinal.

A classificação histológica de Laurén, descrita em 1965, é a mais utilizada para o diagnóstico do CG, e perdura até os dias de hoje, não só pelo seu significado prognóstico quanto pelo seu valor na definição da escolha da abordagem cirúrgica a ser realizada (4, 5, 10). Geralmente, o CG do tipo difuso apresenta prognóstico pior do que o tipo intestinal, requerendo ressecções mais extensas e até gastrectomia total, uma vez que acarreta maior risco de acometimento das margens cirúrgicas (40). Portanto, as margens de segurança ideais devem ser de 5,0 cm para os CG de tipo intestinal e de 10,0 cm para o tipo difuso (41). Além do mais, o CG do tipo difuso é considerado o principal fator de risco para invasão duodenal nos tumores localizados no terço distal do estômago (42).

O significado da classificação de Ming relaciona-se ao potencial invasivo do CG (7). As células neoplásicas com crescimento do tipo expansivo apresentam capacidade de penetração limitada na parede gástrica, o que se reflete em prognóstico mais favorável e com melhores taxas de sobrevivência do que as observadas nas neoplasias com crescimento do tipo infiltrativo (8).

De maneira geral, é possível traçar um paralelo entre a classificação de Laurén e outras classificações morfológicas. A maioria dos tumores com padrão expansivo apresenta características do tipo intestinal de Laurén, enquanto a maioria dos infiltrativos corresponde ao tipo difuso (43).

### *2.2.2 Importância do estadiamento anatomopatológico no carcinoma gástrico*

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 (44, 45) (APÊNDICE A). 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) e é considerada o fator prognóstico mais importante para o estadiamento do CG (3). O estudo anatomopatológico convencional dos espécimes cirúrgicos de CG consiste basicamente na determinação dos parâmetros T (pT) e N (pN) (10).

A profundidade de invasão tumoral é um dos principais parâmetros para a avaliação prognóstica do CG e é ainda mais importante para o planejamento das estratégias terapêuticas a serem adotadas (15). A Associação Japonesa para o Câncer Gástrico (Japanese Gastric Cancer Association - JGCA) foi a primeira a definir como CG precoce (nível T1) a neoplasia restrita à mucosa e à submucosa,

independentemente da presença de acometimento linfonodal (12). A neoplasia que já invade a camada muscular própria da parede gástrica (nível T2), a serosa (nível T3), ou estruturas adjacentes ao estômago (nível T4) é considerada avançada (44). Essa categorização permite a diferenciação mais precisa dos casos que necessitam de tratamento cirúrgico radical, com gastrectomia e linfadenectomia (CG avançado), daqueles que podem ser submetidos apenas ao tratamento endoscópico com mucosectomia ou dissecação da submucosa (CG precoce) (46, 47).

A sobrevida em cinco anos de pacientes com CG precoce pode ultrapassar a taxa de 90%, quando o tratamento for adequado (15). Em contrapartida, em pacientes com neoplasias mais avançadas, estas taxas são menores que 20% (48, 49).

O acometimento dos linfonodos regionais perigástricos é o fator prognóstico mais importante do CG (11, 50, 51). Embora métodos de imagem tenham sido testados para avaliação do acometimento linfonodal no CG, o exame histopatológico dos linfonodos a partir da peça de gastrectomia com linfadenectomia ainda é considerado o método mais confiável para o estadiamento adequado (15, 52, 53).

A incidência geral de metástases linfonodais no CG precoce está entre 10,0% a 15,0%. Ela varia de 2,6% a 4,8% nas neoplasias restritas à mucosa e de 16,5% a 23,6% nas neoplasias que alcançam a camada submucosa (54). Nos CG avançados, a presença de metástases linfonodais ocorre em até 44% dos tumores no estágio T2 e até 64% no estágio T3 (15).

Em relação ao CG precoce, quando são avaliados fatores morfológicos como tamanho do tumor, grau histológico de diferenciação, ulceração e tipo de crescimento, é possível selecionar aqueles que possuem baixo risco para metástases linfonodais (54, 55).

Estudos envolvendo grande número de casos de CG precoce no Japão, submetidos a gastrectomia com linfadenectomia, revelaram que nenhum dos 1.230 tumores intramucosos e bem diferenciados com menos de 3,0 cm apresentava metástases linfonodais ao exame anatomopatológico (56). Nestes casos selecionados, há consenso na literatura de que a gastrectomia com linfadenectomia seria tratamento desnecessariamente agressivo, estando indicada a ressecção endoscópica. Entretanto, essa abordagem deve ser individual e altamente selecionada em cada caso, com estadiamento local bem feito, uma vez que o risco de se detectar metástases linfonodais nestas situações é pequeno, porém não desprezível (2,5%) (15).

Em relação ao pN, a edição mais atual do manual de estadiamento do AJCC/UICC preconiza um mínimo de 15 linfonodos dissecados, que devem ser analisados ao exame anatomopatológico para se obter o valor preditivo adequado do *status* linfonodal (45). Se um número insuficiente de linfonodos for obtido, existe a chance de o paciente ser considerado inapropriadamente livre de metástases linfonodais (57). Este paciente, portanto, seria classificado em estágio mais baixo que o real (pN0) e submetido à terapêutica inadequada, o que acarretaria em tempo de sobrevida menor do que ocorreria caso fosse corretamente estadiado (52).

Apesar dos esforços conjuntos para prevenção, diagnóstico e tratamento do CG, a maioria dos pacientes ainda é diagnosticada em estágios avançados, geralmente com metástases linfonodais (58). Portanto, a taxa de mortalidade do CG é consideravelmente alta em todas as partes do mundo, sendo a sobrevida relativa em cinco anos baixa, girando em torno de 20% a 30% (21).

### 2.2.3 O papel do rastreamento endoscópico no diagnóstico do carcinoma gástrico

Em geral, a falta de manifestações clínicas específicas nas fases iniciais da neoplasia retarda o diagnóstico do CG. Conseqüentemente, 80% a 90% dos pacientes em países ocidentais se apresentam para tratamento médico já com tumores avançados, com baixas chances de cura (3). A endoscopia digestiva alta é o método de rastreamento mais eficaz para a detecção do CG e de suas lesões precursoras (46, 47).

Em países orientais onde o CG é comum, como Japão e Coréia, aproximadamente 80% das neoplasias detectadas em programas de rastreamento endoscópico são precoces (3). Enquanto no Japão a proporção de casos de CG precoce corresponde a 40% do total diagnosticado, na Europa equivale apenas a 15% (15).

Na tentativa de minimizar a quantidade de procedimentos invasivos e melhorar a qualidade de vida do paciente, o tratamento endoscópico tem sido cada vez mais aplicado, especialmente nos países com altas taxas de diagnóstico precoce (59, 60). Entretanto, esses procedimentos não possibilitam a avaliação anatomopatológica dos linfonodos perigástricos, presumindo-se que sejam negativos nestes casos, o que, em última análise, resulta em um estadiamento incompleto da neoplasia pelo sistema TNM.

Os critérios para a indicação do tratamento endoscópico do CG são bem definidos e pouco flexíveis (54, 61, 62). As indicações propostas para a ressecção endoscópica são: adenocarcinoma diferenciado, lesão menor que 2,0 cm, sem ulceração no tumor, uma vez que metástases linfonodais são raras em neoplasias com essas características (54, 59). Para que se possa prescindir da linfadenectomia

nesses casos, é necessário excluir com absoluta segurança a presença de IVL ou IVS no tumor primário ao exame histopatológico (61).

## 2.3 Novos parâmetros prognósticos na avaliação do carcinoma gástrico

As pesquisas atuais sobre doenças neoplásicas se concentram em revelar novos indicadores capazes de prever o comportamento biológico dos tumores e o prognóstico dos pacientes, ainda nas fases iniciais da doença.

Numerosos estudos relatam fatores de risco para metástases linfonodais no CG precoce e avançado, incluindo tamanho e profundidade do tumor, padrão macroscópico, tipo histológico, presença de ulceração tumoral, invasão vascular linfática (IVL), invasão vascular sanguínea (IVS) e densidade microvascular linfática e sanguínea (54, 55, 63-65).

### 2.3.1 Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea

A presença de IVL é considerada fator preditivo da ocorrência de metástases linfonodais em diversas neoplasias malignas, como o carcinoma mamário (66), carcinomas de células renais (67), adenocarcinoma colorretal (68) e prostático (69). A IVL ou IVS pelas células tumorais é pré-requisito para a disseminação neoplásica via redes linfática e sanguínea (70). Estudos recentes mostram que a avaliação da invasão vascular tumoral é essencial para o estadiamento do CG e deve ser incluída no algoritmo terapêutico para seleção de tratamentos adjuvantes mais seletivos (71, 72).

A presença de IVL detectada no tumor primário se correlaciona com a presença de metástases linfonodais e também é considerada fator prognóstico independente nos pacientes com CG (73-75). A presença de IVL também indica

evolução desfavorável mesmo nos pacientes livres de metástases linfonodais (pN0) em neoplasias como o câncer de mama e o CG (76-78).

A avaliação de IVL e IVS se faz especialmente importante nos casos de CG nos quais não há como determinar a presença de metástases linfonodais (79). Dados de estudos retrospectivos indicam que, no CG precoce, a incidência de metástases linfonodais é notadamente mais elevada em casos positivos para IVL do que nos casos negativos (78, 80, 81).

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 CG precoce tratados por ressecção endoscópica (71, 82).

### *2.3.2 Neoformação vascular linfática e sanguínea na carcinogênese gástrica*

A formação de novos vasos sanguíneos, ou angiogênese, ocorre em diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo, no âmbito desses últimos, de fundamental importância na progressão tumoral (83, 84). As células neoplásicas invadem os vasos neoformados e são transportadas a outros sítios no organismo, podendo produzir metástases (85). Portanto, quanto maior a quantidade de vasos neoformados em determinada área, maiores seriam as possibilidades de invasão vascular e metastatização em alguns tipos de neoplasia (86). O desenvolvimento de novo vaso sanguíneo é um fenômeno complexo e resultado de sequência de eventos envolvendo fatores de crescimento produzidos por células neoplásicas e intersticiais (87). Entretanto, os mecanismos que controlam o início da angiogênese ainda não estão totalmente elucidados (88).

O início da angiogênese tumoral, denominado de “*angiogenic switch*”, representa o evento-chave no processo de carcinogênese, indicando o momento em que o tumor inicia o recrutamento de seu suprimento sanguíneo próprio por meio do desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (89, 90). Diversas substâncias endógenas ou produzidas pela própria neoplasia estão implicadas no controle da angiogênese, direta ou indiretamente, estimulando ou inibindo o processo de neoformação vascular (91, 92).

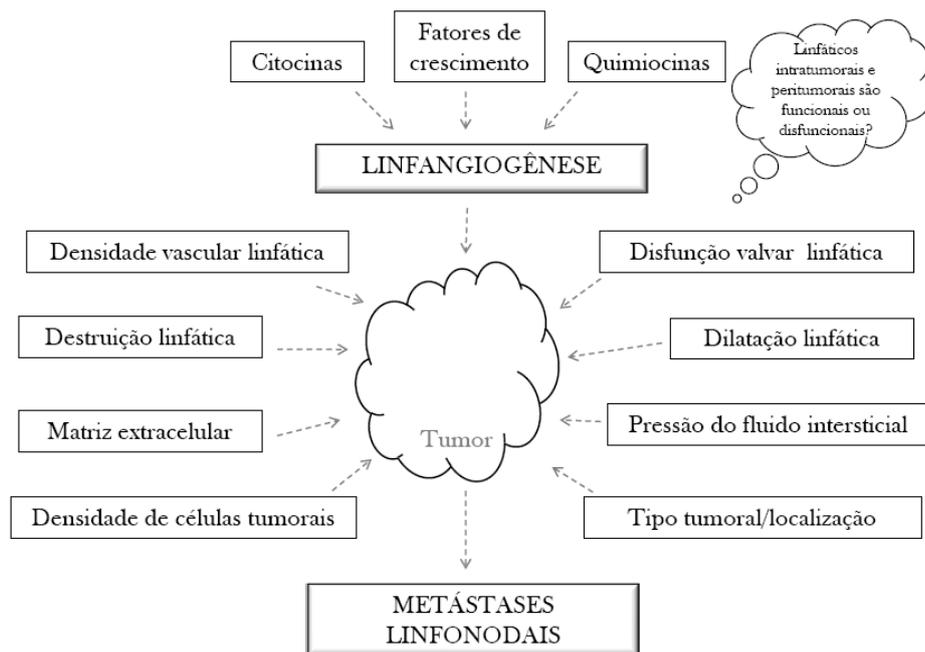
Estudos de caráter experimental revelam que a ativação do fenótipo angiogênico ocorre nas fases mais precoces do desenvolvimento tumoral (93, 94). A angiogênese precede e é necessária para a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (95).

A linfangiogênese é a formação de novos vasos linfáticos, sendo considerada fator de risco para metástases linfonodais, uma vez que aumenta as chances de IVL no CG (96). Diversos estudos propuseram identificar fatores que possam prever a ocorrência de metástases linfonodais no CG, entre eles a linfangiogênese (74, 79). Dentre outros aspectos, esses fatores são importantes na identificação dos pacientes com menor risco de metástases e, portanto, candidatos a tratamentos mais conservadores (61, 97).

Apesar de haver numerosos estudos sobre a angiogênese, são poucos aqueles que avaliam a linfangiogênese como fator prognóstico nas neoplasias. Isso se deve ao fato de que, até recentemente, não havia marcadores IHQ confiáveis ou específicos para o endotélio linfático (98). A partir da maior disponibilidade destes marcadores, o papel da linfangiogênese no desenvolvimento e na disseminação tumoral tem sido melhor elucidado (99).

Os vasos linfáticos geralmente permeiam o estroma tumoral para formar uma rede de drenagem, sugerindo que os pequenos vasos de paredes delgadas oferecem menor resistência e maior área de contato à penetração das células neoplásicas no sistema linfático do que os vasos sanguíneos (100).

Diversos fatores morfológicos e funcionais contribuem para o comportamento biológico e o potencial metastático da neoplasia (FIG. 7). A disseminação tumoral pelo sistema linfático parece depender da rede preexistente e também da linfangiogênese mediada pelos fatores de crescimento derivados do endotélio vascular (VEGF), dentro do tumor e na sua periferia (100-102).



**FIGURA 7:** Diagrama esquemático ilustrando os possíveis fatores preditivos de metástases linfonodais, no qual se destacam os linfáticos intra e peritumorais e a linfangiogênese. *ITLs: intratumoral lymphatics; PTLs: peritumoral lymphatics.*

**FONTE:** adaptado de Rui-Cheng Ji (2006).

## 2.4 Métodos de avaliação de angiogênese e linfangiogênese

A angiogênese e a linfangiogênese podem ser avaliadas diretamente por meio da contagem de vasos ou indiretamente pela análise dos fatores indutores da angiogênese (103, 104). A quantificação dos fatores angiogênicos e linfangiogênicos tem sido amplamente explorada como tentativa de prever o prognóstico de diversos tipos de neoplasias (105-109).

### 2.4.1 Determinação da densidade microvascular

No primeiro relato sobre a correlação entre angiogênese tumoral e metástases, Weidner e colaboradores realizaram estudo quantitativo dos vasos sanguíneos marcados por imuno-histoquímica em regiões de elevada densidade vascular no câncer de mama (109). Do ponto de vista fisiopatológico, pode-se esperar que os mecanismos responsáveis pelas relações diretas e indiretas entre o tumor e as células endoteliais locais são particularmente ativos nestas regiões altamente vascularizadas. Estas áreas supostamente surgiriam devido à existência de clones angiogênicos de células tumorais que, provavelmente, entrariam na circulação e resultariam em metástases. Desde então, estudos subsequentes tentaram avaliar a associação entre a progressão tumoral e o potencial angiogênico das neoplasias, utilizando o método descrito por Weidner *et. al.* (109).

Segundo o método descrito por esses autores, uma vez que a região de interesse tenha sido selecionada em aumento microscópico panorâmico (40x), a contagem individualizada dos microvasos, destacados pelos marcadores imuno-histoquímicos deve ser realizada em aumento microscópico de 200x, que

corresponderia a um campo microscópico de 0,74 milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>). A análise dos demais trabalhos da literatura mostra, porém, que não há padronização em relação aos tamanhos de campo microscópico utilizados na avaliação da angiogênese no câncer, que exibem variações de 0,12 mm<sup>2</sup> a 1,00 mm<sup>2</sup>. Uma área pequena, que corresponderia a uma ampliação mais elevada, permitiria melhor pormenorização da imagem, resultando na identificação, com maior segurança, de maior número de “brotos” de células endoteliais.

A normatização da quantificação de angiogênese é necessária para facilitar a confirmação do seu valor prognóstico em diferentes tipos de neoplasias. Além disso, essa avaliação poderia ser aplicada para prever o risco de transformação de lesões pré-malignas em malignas, além de estimar a resposta ao tratamento.

#### *2.4.2 Marcadores imuno-histoquímicos para contagem vascular*

A densidade microvascular (DMV) avaliada por meio da coloração imuno-histoquímica de células endoteliais pelos marcadores Fator VIII, CD31, CD34 e CD105 tem sido utilizada para quantificar a angiogênese intra-tumoral, sendo considerada como indicador prognóstico independente no CG (73). Além disso, um maior valor de DMV correlaciona-se com menor índice de sobrevida livre de doença (102). Apesar de a maioria das investigações confirmarem uma relação inversa entre DMV e prognóstico, foram observadas discrepâncias em alguns tipos de neoplasia. Uma razão para essas diferenças pode ser a falta, até então, de marcadores capazes de distinguir os vasos sanguíneos normais preexistentes no tecido dos vasos neoformados pelo tumor, que representariam a angiogênese tumoral (110).

O marcador CD105 (endoglina) é uma proteína de adesão da superfície celular expressa predominantemente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos neoformados (111, 112). Estudos mostram que o CD105 está expresso fortemente no endotélio de vasos sanguíneos em neoplasias malignas, quando comparada à sua expressão nos tecidos normais do organismo, o que sugere um papel ativo na angiogênese, ainda não totalmente elucidado (113). Segundo alguns estudos, o CD105 seria o marcador IHQ mais adequado para detectar microvasos neoformados e, portanto, para avaliar a angiogênese tumoral (110, 112). A DMV avaliada pelo CD105 foi associada positivamente com IVS e com metástases hematogênicas (114). Entretanto, ainda não foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre a DMV avaliada pelo CD105 e a presença de metástases linfonodais (115).

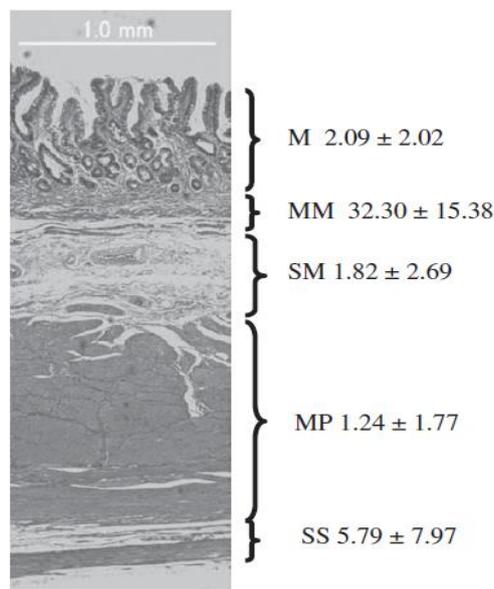
Entre os marcadores pan-endoteliais, o CD34 é amplamente utilizado em diferentes estudos de angiogênese, sendo considerado, atualmente, o melhor marcador vascular, quando comparado ao CD31 e ao Fator VIII (116, 117). A principal restrição à sua utilização como marcador isolado é o fato dele não ser capaz de distinguir vasos sanguíneos de linfáticos (98).

O anticorpo monoclonal D2-40 foi reconhecido inicialmente como marcador de um gene oncofetal presente nas células germinativas fetais (118). Esse marcador é capaz de detectar especificamente o endotélio dos vasos linfáticos (119). Ou seja, a detecção pela IHQ com D2-40 é positiva apenas nos vasos linfáticos e negativa nos vasos sanguíneos (120). Essa especificidade permite utilizá-lo em estudos de invasão vascular linfática em diversas neoplasias e em métodos de determinação da densidade vascular linfática (98, (121)).

### 2.4.3 Importância da avaliação da densidade microvascular linfática no câncer gástrico

A DMV é um parâmetro promissor para a avaliação do prognóstico em diferentes neoplasias (122). Entretanto, estudos clínico-patológicos disponíveis envolvendo DMV e CG produziram resultados pouco consistentes e insuficientes para se chegar a uma conclusão genérica.

Os vasos linfáticos da mucosa gástrica normal estão presentes mais profundamente na lâmina própria. A DVL encontrada na submucosa é bastante similar às densidades da mucosa e muscular própria (75). Em contraste, a muscular da mucosa exhibe DVL aproximadamente dez vezes maior que as demais camadas da parede gástrica normal, como demonstrado na Figura 8 (75).



**FIGURA 8:** Densidade Vascular Linfática nas diferentes camadas da parede gástrica normal. Média  $\pm$ DP de 30 pontos (por milímetro quadrado). M: mucosa; MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; MP: muscular própria; SS: subserosa.

**FONTE:** Sako A. *et al.* (2006).

Em consequência da distribuição dos linfáticos na parede gástrica, a presença de IVL é mais frequentemente observada na camada muscular da mucosa nos CG precoces (75). Outros estudos encontraram a maior concentração de IVL nas zonas periféricas do tumor ou peritumorais, porém também em regiões adjacentes à muscular da mucosa, mesmo em CG avançados, que exibem invasão mais profunda da parede gástrica (123, 124). Essas observações são especialmente importantes na avaliação do CG precoce, que já ultrapassa a camada muscular da mucosa e atinge a submucosa, submetido à ressecção endoscópica. Paralelamente à DMV, a densidade vascular linfática (DVL) é fator prognóstico no CG, correlacionando-se com a presença de metástases linfonodais e com menor sobrevida dos pacientes (74). A DVL avaliada em áreas peritumorais, mas não intratumorais, é fator de risco para metástases linfonodais nos CG avançados (124).

## 3 MATERIAL E MÉTODO

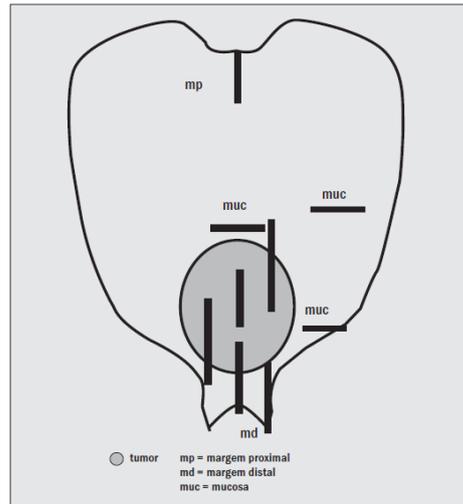
### 3.1 Seleção dos casos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Protocolo Nº 574/07 (APÊNDICE A). Trata-se de estudo transversal retrospectivo de uma série de casos de CG primário, com revisão histopatológica e estudo IHQ.

Foram selecionados 95 casos consecutivos de CG primário de pacientes diagnosticados e tratados cirurgicamente no Hospital das Clínicas (HC) da UFMG – Belo Horizonte, no período de 2002 a 2006. Todos os pacientes foram submetidos a gastrectomia total, subtotal ou parcial, e a linfadenectomia.

Os casos selecionados foram obtidos a partir de análise retrospectiva de casos de CG do arquivo do Laboratório de Pesquisa em Patologia do Trato Gastrointestinal (LP-TGI) do Serviço de Anatomia Patológica (APM) do HC-UFMG. A seleção dos casos foi realizada inicialmente pela análise dos dados do protocolo anatomopatológico do LP-TGI, que estão informatizados (APÊNDICE B). O protocolo anatomopatológico foi criado com o objetivo de padronizar os estudos macro e microscópico de todas as peças de gastrectomia realizadas em pacientes com câncer gástrico (9). O protocolo compreende as avaliações macro e microscópica da neoplasia, incluindo: medidas do tumor, tipo macroscópico de Borrmann (14), localização, tipo histológico segundo a classificação de Laurén (4) e da OMS (3), padrão de crescimento descrito por Ming (7), presença de IVL e IVS e estadiamento anatomopatológico pelo TNM (45).

Todas as amostras retiradas das peças de gastrectomia para o estudo histopatológico, de acordo com o mapa de clivagem do protocolo do APM (FIG. 9), haviam sido fixadas previamente em formol a 10% e processadas rotineiramente no APM, estando incluídas em blocos de parafina.



**FIGURA 9:** Mapa de Clivagem para o processamento das peças cirúrgicas de carcinoma gástrico: amostragem para exame histológico.

**FONTE:** Lemes (2003).

Os critérios para a inclusão no estudo foram: informações clínicas suficientes e amostras representativas do tumor disponíveis em blocos de parafina nos arquivos do APM do HC-UFMG. Os casos analisados que não dispunham de informações no protocolo anatomopatológico, de lâminas coradas em HE para a revisão histopatológica ou dos blocos de parafina correspondentes não foram incluídos do estudo.

Alguns dados clínico-patológicos como gênero, idade dos pacientes ao diagnóstico, topografia do tumor, classificação macroscópica e presença de metástases à distância foram obtidos a partir do banco de dados e da revisão do protocolo anatomopatológico.

### **3.2 Estudo morfológico 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: classificação histológica do tumor segundo Laurén (4), padrão de crescimento (7), grau histológico de diferenciação, classificação do tipo histológico do tumor segundo a OMS (3) e profundidade do tumor, segundo o sistema TNM (45).

A revisão de todas as lâminas foi realizada por dois patologistas com experiência em patologia cirúrgica e do trato gastrointestinal (MMDAC e LTG), simultaneamente em microscópio de dupla observação.

### **3.3 Estudo imuno-histoquímico**

A seleção dos blocos para estudo IHQ foi feita após a revisão histopatológica das lâminas coradas pela 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 (sequenciais) 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) e CD105 (marcador de vasos sanguíneos neoformados), detalhados no Quadro 1.

ANTICORPO	CLONE	TIPO	DILUIÇÃO	REATIVAÇÃO ANTIGÊNICA	FABRICANTE
D2-40	D2-40	Monoclonal	1:30	Citrato (pH=6,0)	Dako, US®
CD34	QBEND/10	Monoclonal	1:10	EDTA (pH=9,0)	Biogenex, US®
CD105	4G11	Monoclonal	1:20	EDTA (pH=9,0)	Dako, US®

**QUADRO 1:** Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico.

A técnica IHQ utilizada foi da estreptavidina-biotina peroxidase (Dako LSAB®+ System).

Todas as lâminas foram submetidas ao pré-tratamento em solução tampão a 98°C em panela a vapor por 20 minutos, para recuperação antigênica. Foram realizados bloqueios da peroxidase endógena e da proteína avidina, por 15 minutos cada. Os anticorpos primários D2-40, CD34 e CD105 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 sabidamente positivos foram incluídos em todas as reações. Controles negativos consistiram na substituição dos anti-soros primários por imunoglobulinas de coelho ou cabra da mesma classe dos anticorpos primários.

### **3.4 Avaliação de invasão vascular**

A avaliação de invasão vascular foi realizada em todos os 95 casos da amostra. 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 sequencial das lâminas e simultânea por dois patologistas (MMDAC e LTG), em microscópio de dupla observação, sem conhecimento prévio 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 visualizado claramente no interior de um lúmen vascular revestido por endotélio evidente (98, 103). Não foram considerados como invasão de vasos os ninhos de células neoplásicas com artefato de retração, sem endotélio 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*

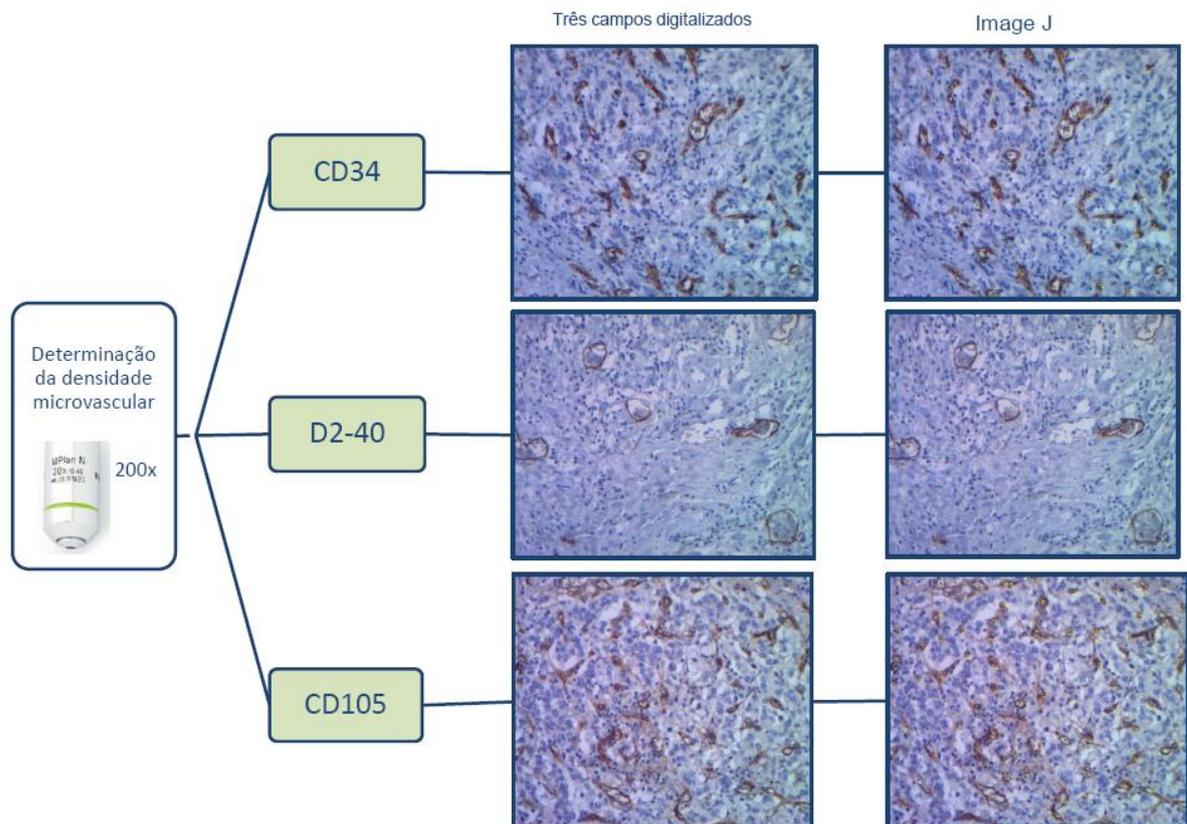
Em cada caso, foram examinadas as lâminas coradas pelos dois marcadores imuno-histoquímicos (CD34 e D2-40), para avaliação da presença de IVL e IVS.

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. Para a definição de IVL, os êmbolos neoplásicos deveriam ser circundados por endotélio corado positivamente pelo D2-40, sem hemácias ou músculo liso.

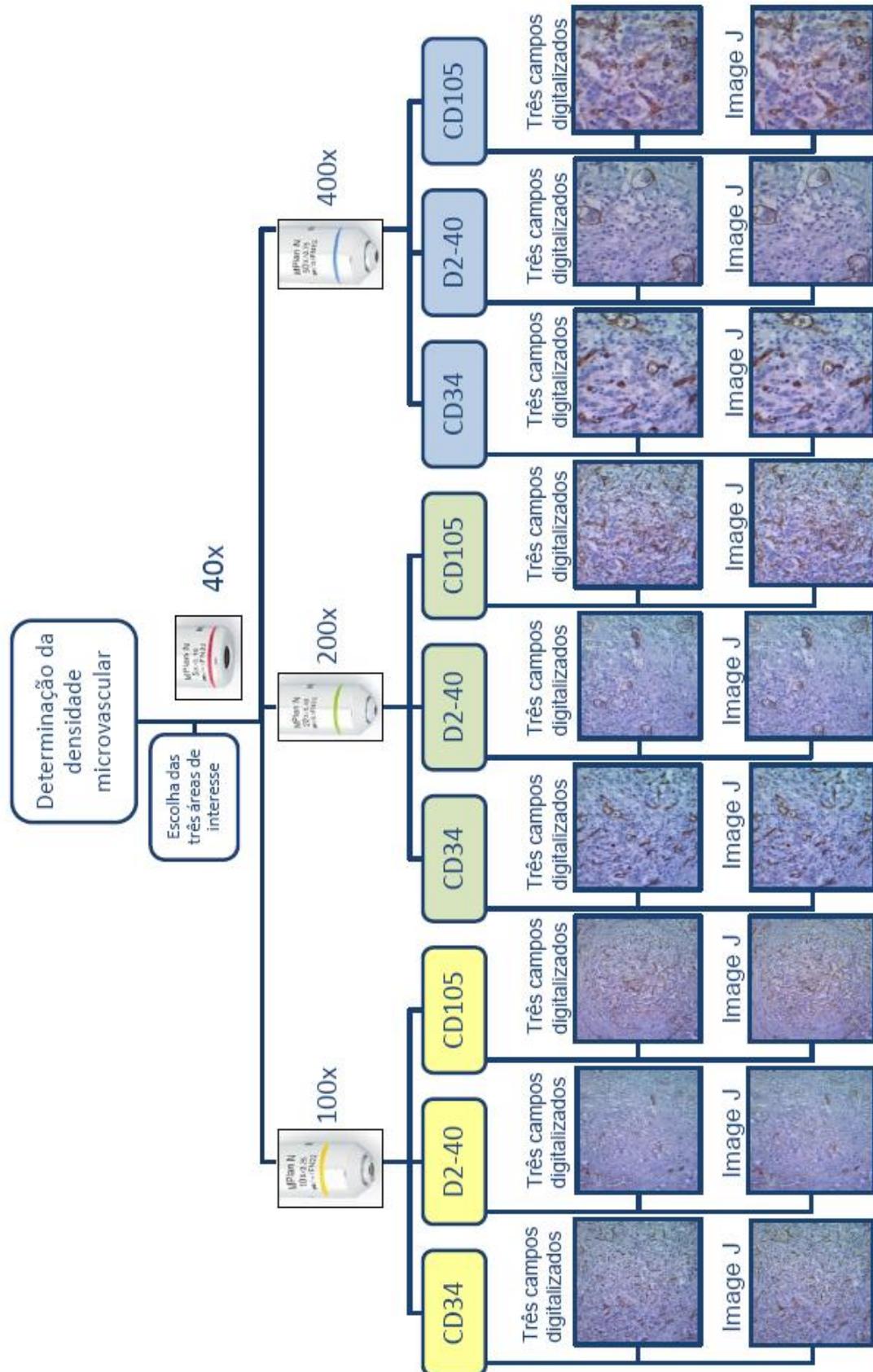
### **3.5 Determinação da densidade microvascular**

Para a realização da quantificação da microvascularização, foram selecionados 52 casos a partir da amostra inicial. Cada caso selecionado estava representado por três lâminas marcadas por CD34, D2-40 e CD105. A determinação da DMV foi realizada conforme o método descrito por Weidner et al (109). As três áreas mais altamente vascularizadas do tumor, denominadas “*hot spots*”, foram detectadas inicialmente em menor aumento (40x) e selecionadas em cada uma das lâminas coradas pelos três marcadores. Então, foi feita a digitalização destas áreas de interesse para posterior análise morfométrica, por meio do sistema de captura acoplado ao microscópio. Utilizando o software livre do National Institutes of Health (NIH) denominado *Image J*, foi realizada a contagem dos microvasos de cada caso nessas três áreas fotografadas, nas lâminas coradas pelos três marcadores, e em três aumentos microscópicos diferentes (100x, 200x e 400x). O padrão de marcação ideal do endotélio observado foi membranoso ou citoplasmático, com mínima coloração de fundo. Células endoteliais isoladas ou grupos delas, com ou sem lúmen foram considerados como vasos individuais. A média da contagem das três áreas em cada aumento microscópico foi considerada o valor de DMV daquele aumento, em cada um dos marcadores. As lâminas foram examinadas sem

conhecimento do estágio clínico do paciente. O desenho esquemático do método utilizado está demonstrado nas Figuras 10 e 11. No total, foi realizada a contagem microvascular de 468 campos microscópicos digitalizados utilizando-se aumento de 100x. Da mesma forma, foram contados os vasos em 468 campos microscópicos digitalizados utilizando aumento de 200x e outros 468 campos com aumento de 400x.



**FIGURA 10:** Exemplo de caso com contagem microvascular em cada um dos marcadores utilizando o aumento microscópico de 200x.



**FIGURA 11:** Esquema ilustrativo do método utilizado para contagem vascular aplicada em um caso da amostra.

### 3.5 Análise estatística

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

O teste de McNemar foi usado para analisar a concordância entre os diferentes métodos de avaliação de invasão vascular (HE e IHQ). O coeficiente de Kappa de Cohen foi utilizado para verificar se essa concordância foi uma variação puramente aleatória (125). 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, presença de metástases, profundidade do tumor), o teste Qui-quadrado foi aplicado.

<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

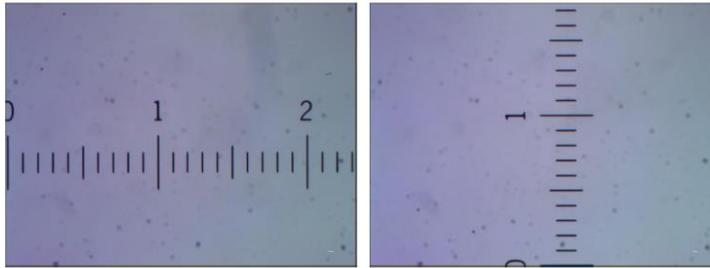
**QUADRO 2:** Resultados dos coeficientes de concordância de Kappa de acordo com a classificação de Landis & Koch.

**FONTE:** Landis & Koch (1977).

A densidade microvascular foi calculada para cada aumento e cada marcador utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Densidade microvascular (DMV)} = \frac{\text{Média da contagem vascular em três campos}}{\text{Área do campo microscópico em destaque}}$$

A área de cada campo microscópico digitalizado foi medida utilizando uma lâmina milimetrada, com os valores de altura e largura de cada aumento em estudo previamente fotografado (FIG.12). As áreas dos campos microscópicos obtidas para cada aumento estão demonstradas no Quadro 3.



**FIGURA 12:** Fotomicrografias de lâmina milimetrada para o cálculo da área do campo microscópico.

NIKON				
CAMPO	altura	largura	AREA	unidade
100x	0,75mm	1,0mm	0,75	mm <sup>2</sup>
200x	0,38mm	0,5mm	0,19	mm <sup>2</sup>
400x	0,18mm	0,24mm	0,0432	mm <sup>2</sup>

**QUADRO 3:** Área dos campos microscópicos obtida para cada aumento microscópico (100x, 200x, 400x).

Para avaliar a existência de diferença significativa entre as médias dos valores de DMV encontrados em cada aumento microscópico, utilizamos o teste de análise de variância ANOVA. A associação entre os valores de DMV obtida pelos três marcadores com outros fatores prognósticos, como metástases linfonodais, profundidade de invasão, IVL e IVS foi examinada utilizando os testes para variáveis não paramétricas de Mann-Whitney *U* e Kruskal-Wallis.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características gerais da amostra

#### 4.1.1 Características clínico-patológicas dos casos

A maioria dos 95 pacientes foi submetida à gastrectomia subtotal (57 pacientes) e total (26 pacientes), enquanto apenas 12 pacientes à gastrectomia parcial. A idade dos pacientes, por ocasião do diagnóstico da neoplasia, variou entre 36 e 93 anos, sendo a média de 65 anos e o desvio-padrão 14,6. A mediana foi igual a 68 anos. Sessenta e dois pacientes (65,2%) eram do sexo masculino e 33 do sexo feminino (34,7%).

Vinte e um casos representavam CG precoces (pT1) e 74 casos correspondiam a CG avançados (pT2, pT3 e pT4). Quanto aos tumores avançados, a maioria (51 casos) exibia invasão tumoral até a serosa (pT3).

A maioria dos tumores estava localizada na região do antro, no terço distal do estômago (55 casos, 57,9%) e na pequena curvatura (54 casos, 56,8%). Em relação às neoplasias avançadas, os tipos macroscópicos de Borrmann mais observados foram II e III, com 30 e 27 casos, respectivamente. Os tipos IIb (5 casos) e III (5 casos) da SJED foram os mais freqüentes dentre os CG precoces.

O número de linfonodos dissecados em todos os casos variou de 12 a 63, com uma média de 24 linfonodos por caso e um desvio-padrão de 12,1. Foram detectadas metástases linfonodais em 61 pacientes (64,2%). Em seis casos, o número de linfonodos obtidos foi menor que 15, portanto insuficiente para o estadiamento linfonodal (pNx). Metástases à distância estavam presentes em oito

pacientes. Foi observada invasão por continuidade do duodeno em 23 pacientes, do esôfago em oito e de ambos em três pacientes. As características clínico-patológicas da amostra estão representadas na Tabela 1.

**TABELA 1:** Características clínico-patológicas da amostra (N=95).

<b>Dados Clínico-patológicos</b>	<b>N = 95 (%)</b>
<b>Gênero</b>	
<i>masculino</i>	62 (65,3)
<i>feminino</i>	33 (34,7)
<b>Tipo de cirurgia</b>	
<i>Gastrectomia parcial</i>	12 (12,6)
<i>Gastrectomia subtotal</i>	57 (60,0)
<i>Gastrectomia total</i>	26 (27,4)
<b>Topografia do tumor</b>	
<i>Terço proximal</i>	12 (12,6)
<i>Terço médio</i>	12 (12,6)
<i>Terço distal</i>	55 (57,9)
<i>Terço proximal+médio</i>	1 (1,1)
<i>Terço médio+distal</i>	6 (6,3)
<i>Terço proximal+médio+distal</i>	7 (7,4)
<i>Junção esôfago-gástrica (JEG)</i>	1 (1,1)
<i>NA</i>	1 (1,1)
<b>Curvatura acometida</b>	
<i>pequena curvatura</i>	54 (56,8)
<i>grande curvatura</i>	10 (10,5)
<i>pequena e grande</i>	14 (14,7)
<i>NA</i>	17 (17,9)
<b>Tipo macroscópico</b>	
<i>SJED I</i>	0
<i>SJED IIa</i>	2 (2,1)
<i>SJED IIb</i>	5 (5,3)
<i>SJED IIc</i>	2 (2,1)
<i>SJED III</i>	5 (5,3)
<i>Borrmann I</i>	7 (7,4)
<i>Borrmann II</i>	30 (31,6)
<i>Borrmann III</i>	27 (28,4)
<i>Borrmann IV</i>	12 (12,6)
<i>NA</i>	5 (5,3)

(Continuação)

<b>Dados Clínico-patológicos</b>	<b>N = 95 (%)</b>
<b>Profundidade do tumor (pT)</b>	
<i>pT1a</i>	9 (9,5)
<i>pT1b</i>	12 (12,6)
<i>pT2a</i>	12 (12,6)
<i>pT2b</i>	8 (8,4)
<i>pT3</i>	51 (53,7)
<i>pT4</i>	3 (3,2)
<b>Metástases linfonodais (pN)</b>	
<i>pN0</i>	28 (29,5)
<i>pN1</i>	36 (37,9)
<i>pN2</i>	13 (13,7)
<i>pN3</i>	12 (12,6)
<i>pNx</i>	6 (6,3)
<b>Metástases à distância (pM)</b>	
<i>pMx</i>	87 (91,6)
<i>pM1</i>	8 (8,4)
<b>Invasão de órgãos</b>	
<i>Negativa</i>	57 (60,0)
<i>Duodeno</i>	23 (24,2)
<i>Esôfago</i>	8 (8,4)
<i>Esôfago + duodeno</i>	3 (3,2)
<i>Outros</i>	4 (4,2)

NA: não avaliado  
SJED: Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva

#### 4.1.2 Revisão histopatológica

A revisão histopatológica dos 95 casos em estudo mostrou a seguinte distribuição segundo a classificação de Laurén: 45 casos de CG do tipo intestinal (47,4%), 25 do tipo difuso (26,3%) e 25 do tipo misto/NC (26,3%). O tipo histológico da OMS mais freqüente foi o adenocarcinoma SOE (48 casos, 50,5%), seguido pelo carcinoma de células em anel de sinete (22 casos, 23,2%), carcinoma indiferenciado (9 casos, 9,5%) e pelos tipos tubular e papilífero (5 casos cada, 5,3%). A classificação de Ming do padrão de crescimento foi equivalente entre os tipos expansivo e infiltrativo, ambos contabilizando 40 casos (42,1%). As informações obtidas na revisão histopatológica estão demonstradas na Tabela 2.

**TABELA 2:** Revisão histopatológica dos casos de carcinoma gástrico (N=95).

<b>Dados Histopatológicos</b>	<b>N = 95 (%)</b>
<b>Tipo histológico de Laurén</b>	
<i>intestinal</i>	45 (47,4)
<i>difuso</i>	25 (26,3)
<i>misto/NC</i>	25 (26,3)
<b>Tipo histológico da OMS</b>	
<i>adenocarcinoma SOE</i>	48 (50,5)
<i>tubular</i>	5 (5,3)
<i>papilífero</i>	5 (5,3)
<i>mucinoso</i>	4 (4,2)
<i>células em anel de sinete</i>	22 (23,2)
<i>indiferenciado</i>	9 (9,5)
<i>outros</i>	2 (2,2)
<b>Padrão de crescimento (Ming)</b>	
<i>expansivo</i>	40 (42,1)
<i>infiltrativo</i>	40 (42,1)
<i>NA</i>	15 (15,8)

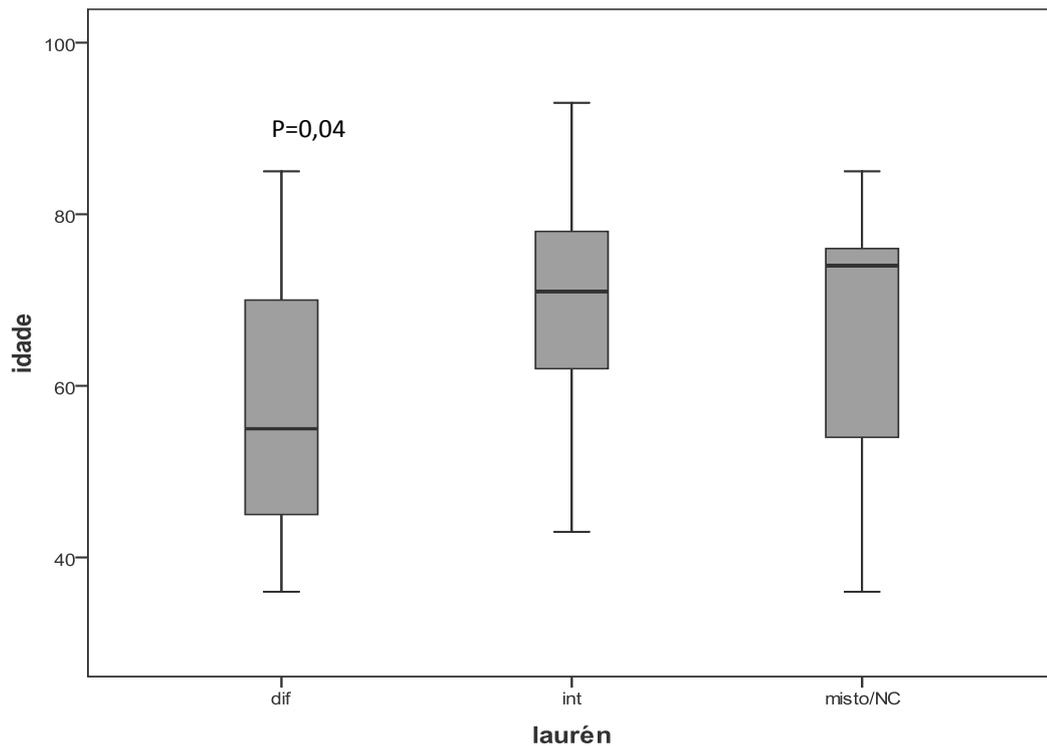
NA: não avaliado

NC: não classificável

SOE: sem outra especificação

#### 4.1.3 Comparação entre as variáveis clínico-patológicas idade e profundidade tumoral com a classificação histológica de Laurén

A análise das faixas etárias de acometimento do CG em nossa amostra, segundo os tipos histológicos de Laurén, mostra que o CG tipo difuso ocorreu em pacientes numa faixa etária mais jovem que as dos tipos intestinal e misto/NC. O teste de Mann-Whitney U para a variável quantitativa demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes com neoplasias do tipo difuso em relação ao grupo do tipo intestinal ( $p=0,04$ ). Não houve relação significativa entre o tipo misto/NC com os demais grupos. Os dados estão demonstrados no Gráfico 1.



**GRÁFICO 1:** Boxplot com comparação entre faixa de idade dos pacientes e tipos de carcinoma gástrico, segundo a classificação histológica de Laurén. dif: difuso; int: intestinal; misto/NC: misto/não classificável.

Dentre os CG do tipo intestinal de Laurén, 11 eram precoces (24,4%) e 34 avançados (75,5%). Oito de 25 casos de CG do tipo difuso eram precoces (32,0%) e os 17 restantes eram avançados (68,0%). Os CG do tipo misto/NC tinham apenas 2 representantes no grupo dos CG precoces (8,0%), enquanto 23 eram avançados (92,0%). Houve relação estatisticamente significativa entre a profundidade de invasão tumoral (CG precoce e avançado) com a classificação histológica de Laurén para as neoplasias dos tipos difuso e misto/NC. Esses valores estão demonstrados na Tabela 3.

**TABELA 3:** Comparação entre a classificação histológica de Laurén e a profundidade tumoral em 95 casos de carcinoma gástrico (N=95).

Classificação histológica de Laurén	Profundidade de invasão do carcinoma gástrico		Valor de p
	Precoce (%)	Avançado (%)	
<b>Intestinal</b>	11 (24)	34 (76)	0,108
<b>Difuso</b>	8 (32)	17 (68)	} <b>0,034*</b>
<b>Misto/NC</b>	2 (8)	23 (92)	
<b>Total</b>	21	74	

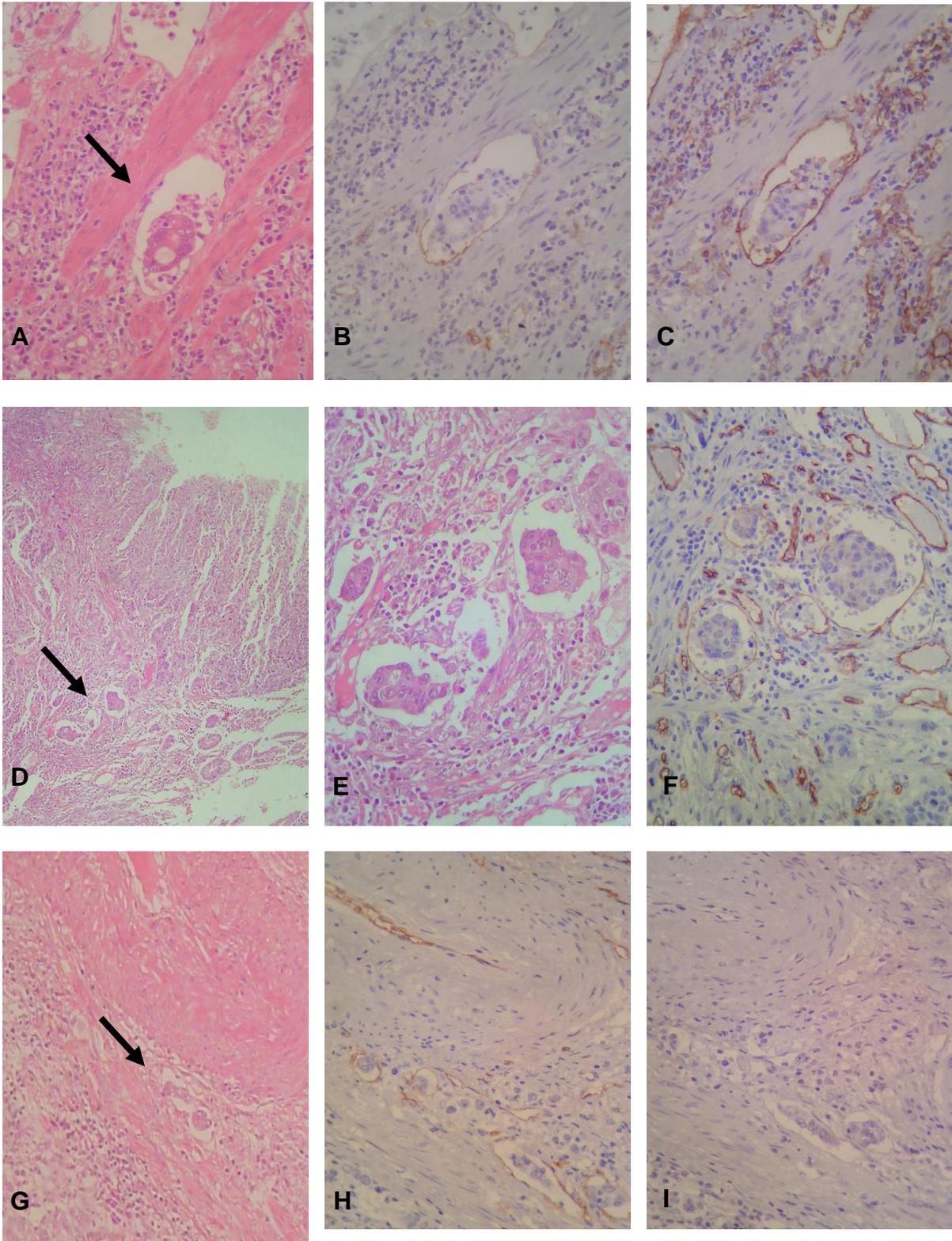
\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Qui-quadrado)  
**NC:** não-classificável

## 4.2 Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea

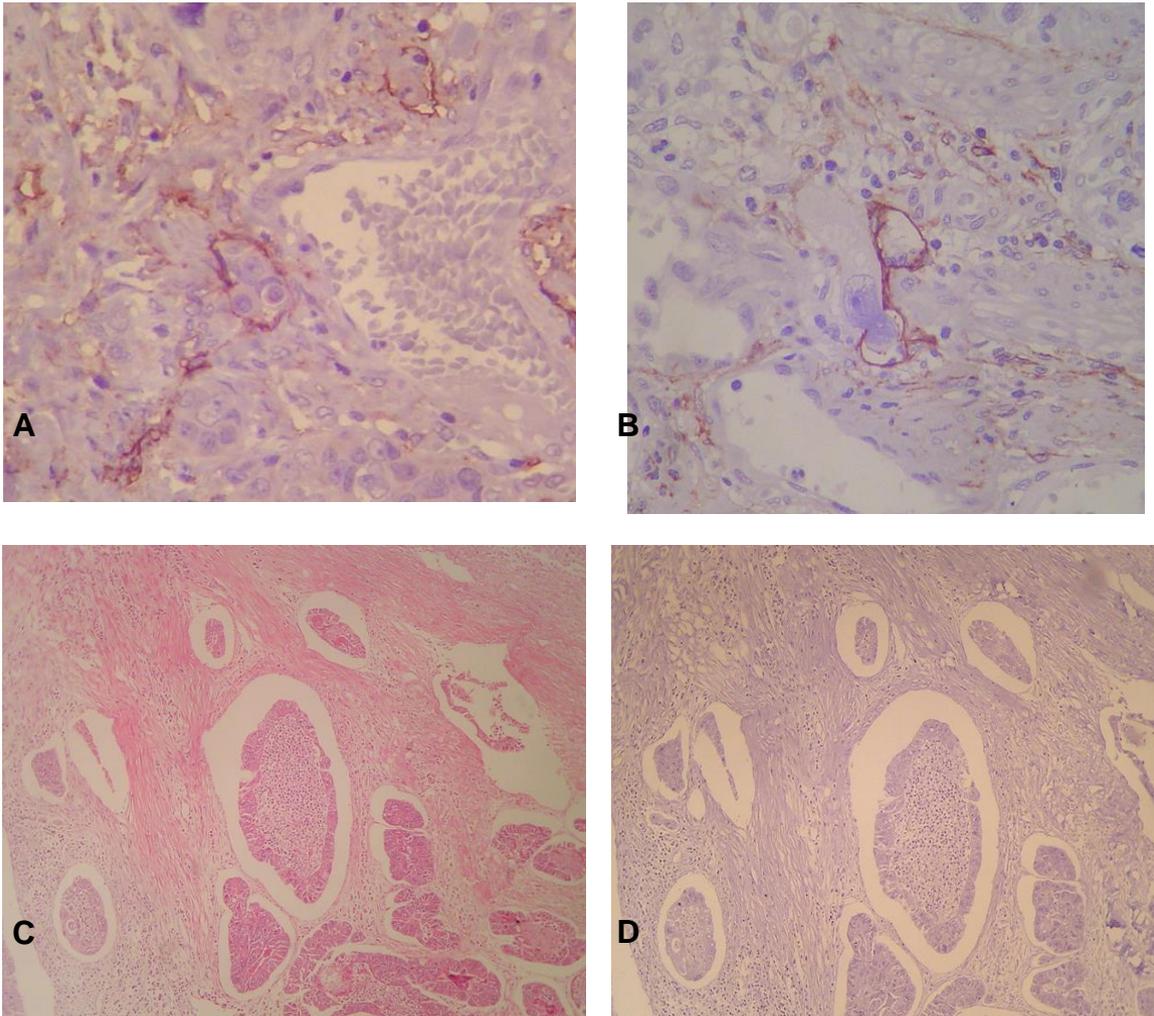
### 4.2.1 Invasão vascular linfática e invasão vascular sanguínea

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 considerada quando a marcação IHQ era negativa para D2-40 e positiva para CD34, aliada à presença de hemácias no lúmen vascular (FIG.13).

Alguns exemplos de IVL não detectada ao exame histopatológico convencional (HE) estão demonstrados na Figura 14, bem como um caso em que a IVL detectada ao HE não foi confirmada pelo exame IHQ.



**FIGURA 13:** Fotomicrografias dos cortes seriados de invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela HE (seta) e IHQ. **A:** IVL HE (x400). **B:** IVL marcação por CD34 (x400). **C:** IVL marcação por D2-40 (x400). **D:** IVS HE (x100). **E:** IVS HE (x400). **F:** IVS marcação por CD34 (x400). **G:** IVS HE (x200). **H:** IVS marcação por CD34 (x200) **I:** IVS marcação por D2-40 (x200).



**FIGURA 14:** Fotomicrografias de cortes seriados de invasão vascular linfática detectada apenas pela IHQ e de falsa invasão vascular linfática e/ou sanguínea diagnosticada ao HE. **A e B:** IVL marcação por D2-40 (x400); **C:** falsa IVL HE (x100); **D:** falsa IVL marcação por D2-40 (x100).

A detecção de IVL foi consideravelmente maior que a de IVS. A presença de IVL foi detectada em 61/95 casos (64,2%) pela HE e em 66/95 casos (69,5%) pela IHQ, como demonstrado na Tabela 4. A IVS foi evidenciada em 38/95 casos (40,0%) pela HE e pela IHQ em apenas 24 casos (25,2%), como visualizado na Tabela 5.

**TABELA 4:** Avaliação da invasão vascular linfática pelos métodos de HE e IHQ (N=95).

		IVL – HE		Total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
IVL – IHQ	Negativo	21	8	29	0,38
	Positivo	13	53	66	
	Total	34	61	95	

IVL: invasão vascular linfática  
 HE: coloração de rotina HE  
 IHQ: método imuno-histoquímico  
 Teste de McNemar

**TABELA 5:** Avaliação da invasão vascular sanguínea pelos métodos de HE e IHQ (n=95).

		IVS – HE		Total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
IVS – IHQ	Negativo	47	24	71	0,02*
	Positivo	10	14	24	
	Total	57	38	95	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste McNemar)  
 IVS: invasão vascular sanguínea  
 HE: coloração de rotina HE  
 IHQ: método imuno-histoquímico

#### 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 ( $p=0,38$ ). A presença de IVS detectada pela IHQ foi significativamente

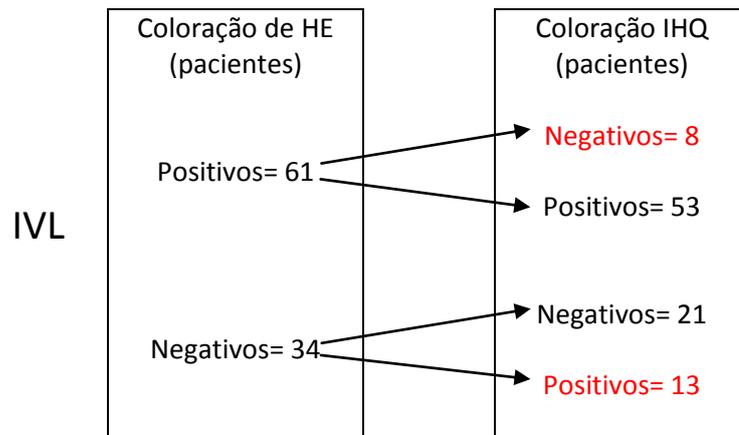
menor que ao HE ( $p=0,02$ ). O coeficiente de Kappa para a concordância diagnóstica entre ambos os métodos foi moderado para IVL (Kappa=0,50) e baixo para a IVS (Kappa=0,20), conforme demonstrado na Tabela 6.

**TABELA 6:** Comparação entre a concordância diagnóstica na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela HE e pela IHQ (N=95).

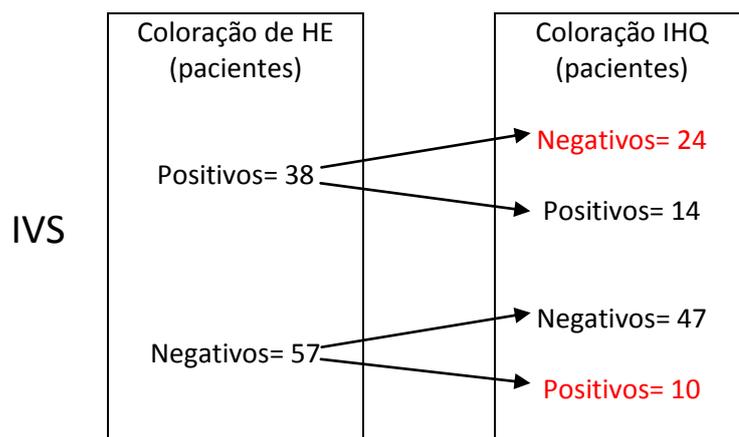
		<i>Avaliação ao HE</i>	<i>Avaliação à IHQ</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Kappa</i>
<b>IVL</b>	<b>Positivo</b>	61	66	0,38	0,50
	<b>Negativo</b>	34	29		
<b>IVS</b>	<b>Positivo</b>	38	26	<b>0,02*</b>	0,20
	<b>Negativo</b>	57	69		

\* diferença entre os valores foi estatisticamente significativa (teste McNemar)  
 IVL: invasão vascular linfática  
 IVS: invasão vascular sanguínea  
 HE: coloração de rotina HE  
 IHQ: método imuno-histoquímico

A análise da Figura 15 mostra comparativamente a detecção de IVL pela HE e à IHQ. Dentre os 61 casos com IVL detectada ao HE, 8 casos (13,1%) não foram confirmados à IHQ. Em contrapartida, observamos IVL à IHQ em 13 casos (38,2% dos casos negativos ao HE), que não haviam sido previamente detectados pela HE ao exame histopatológico. A Figura 16 representa a avaliação comparativa da detecção de IVS pelos métodos HE e IHQ. Foram detectados 38 casos de IVS ao HE, dos quais 24 (63,1%) não foram confirmados pela IHQ. Dentre os casos negativos ao HE, 10 casos de IVS (17,5%) foram identificados à IHQ.



**FIGURA 15:** Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular linfática em 95 casos de CG.



**FIGURA 16:** Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular sanguínea em 95 casos de CG.

#### 4.2.3 Comparação entre invasão vascular e metástases linfonodais

A associação entre a IVL e a presença de metástases foi estatisticamente significativa, tanto na avaliação pelo método de rotina (HE), quanto pelo método IHQ ( $p=0,001$ ). A presença de IVS também se correlacionou positivamente com a

presença de metástases linfonodais quando avaliada pela HE ( $p=0,013$ ) e pela IHQ ( $p=0,019$ ). Esses resultados estão dispostos na Tabela 7. Em seis casos, a quantidade de linfonodos obtidos foi insuficiente para o estadiamento linfonodal. Portanto, esses casos foram excluídos da análise de correlação com outras variáveis, resultando numa amostra constituída por 89 casos.

**TABELA 7:** Comparação entre a detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela HE e IHQ e a presença de metástases linfonodais (N=89).

Invasão Vascular		Metástases linfonodais		Valor de P
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
IVL - HE	Negativa	23 (71,8)	9 (28,2)	<b>0,001*</b>
	Positiva	5 (8,8)	52 (91,2)	
IVL - IHQ	Negativa	20 (74,0)	7 (26,0)	<b>0,001*</b>
	Positiva	8 (13,0)	54 (87,0)	
IVS - HE	Negativa	22 (41,5)	31 (58,5)	<b>0,013*</b>
	Positiva	6 (16,6)	30 (83,4)	
IVS - IHQ	Negativa	25 (38,5)	40 (61,5)	<b>0,019*</b>
	Positiva	3 (12,5)	21 (87,5)	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Qui-quadrado)

IVL: invasão vascular linfática

IVS: invasão vascular sanguínea

HE – hematoxilina-eosina

IHQ – imuno-histoquímica

#### 4.2.4 Associação entre variáveis clínico-patológicas e invasão vascular

Quando analisamos a IVL detectada pelo exame IHQ, podemos identificar relação estatisticamente significativa com a topografia no terço distal do estômago, quando comparadas às demais localizações ( $p=0,039$ ). Os tumores precoces mostraram uma proporção de IVL significativamente menor que os tumores

avançados ( $p=0,001$ ). As neoplasias avançadas com padrão macroscópico tipo I de Borrmann apresentaram diferença significativa quando comparadas aos tumores com os demais padrões, em relação à presença de IVL ( $p=0,001$ ). Outra variável significativa em relação à IVL foi a presença de invasão de órgãos por continuidade ( $p=0,003$ ).

Não foi observada associação significativa entre a presença de IVL e as seguintes variáveis: gênero, curvatura acometida, tipo macroscópico da SJED para tumores precoces, tipo histológico de Laurén, padrão de crescimento de Ming e metástases à distância.

Em relação à presença de IVS, a única variável estatisticamente significativa foi a categorização da neoplasia em CG precoce ou avançado ( $p=0,003$ ). Todas as demais variáveis analisadas não mostraram associação com a presença de IVS. Os dados estão demonstrados na Tabela 8.

**TABELA 8:** Associação entre parâmetros clínico-patológicos e as presenças de invasão vascular linfática e sanguínea pela IHQ (N=95).

Dados Clínico-patológicos	IVL – IHQ			IVS – IHQ		
	Negativo N (%)	Positivo N (%)	<i>p</i>	Negativo N (%)	Positivo N (%)	<i>p</i>
<b>Gênero</b>						
<i>masculino</i>	20 (32,2)	42 (67,8)	0,615	45 (72,5)	17 (27,5)	0,507
<i>feminino</i>	9 (27,3)	24 (72,7)		26 (78,7)	7 (21,3)	
<b>Topografia do tumor</b>						
<i>Terço distal</i>	15 (27,3)	40 (72,7)	<b>0,039*</b>	42 (76,3)	13 (23,7)	0,281
<i>Demais localizações</i>	14 (35)	26 (65)		29 (72,5)	11 (27,5)	
<b>Curvatura acometida</b>						
<i>pequena curvatura</i>	19 (35,2)	35 (64,8)	0,122	41 (76)	13 (24)	0,131

(Continuação)

Dados Clínico-patológicos	IVL – IHQ			IVS – IHQ		
	Negativo N (%)	Positivo N (%)	<i>p</i>	Negativo N (%)	Positivo N (%)	<i>p</i>
<i>grande curvatura</i>	3 (30)	7 (70)		8 (80)	2 (20)	
<i>pequena e grande</i>	1 (7,2)	13 (92,8)		7 (50)	7 (50)	
<b>Tipo macroscópico (prec.)</b>						
<i>SJED IIa</i>	2 (100)	0	0,241	2 (100)	0	NA
<i>SJED IIb</i>	5 (100)	0		5 (100)	0	
<i>SJED IIc</i>	2 (100)	0		2 (100)	0	
<i>SJED III</i>	3 (60)	2 (40)		5 (100)	0	
<b>Tipo macroscópico (avanç)</b>						
<i>Borrmann I</i>	5 (71,4)	2 (28,6)	<b>0,001*</b>	7 (100)	0	0,24
<i>Borrmann II</i>	4 (13,3)	26 (86,7)		21 (70)	9 (30)	
<i>Borrmann III</i>	5 (18,5)	22 (81,5)		17 (62,9)	10 (37,1)	
<i>Borrmann IV</i>	0	12 (100)		7 (58,3)	5 (41,7)	
<b>Invasão de órgãos</b>						
<i>Negativa</i>	26 (45,6)	31 (54,4)	<b>0,003*</b>	46 (80,7)	11 (19,3)	0,297
<i>Duodeno</i>	1 (4,3)	22 (95,7)		15 (65,2)	8 (34,8)	
<i>Esôfago</i>	1 (12,5)	7 (87,5)		6 (75)	2 (25)	
<i>Esôfago + duodeno</i>	0	3 (100)		1 (33,3)	2 (66,7)	
<i>Outros</i>	1 (25)	3 (75)		3 (75)	1 (25)	
<b>Profundidade do tumor</b>						
<i>Precoce</i>	17 (80,9)	4 (19,1)	<b>0,001*</b>	21 (100)	0	<b>0,003*</b>
<i>Avançado</i>	12 (16,2)	62 (83,8)		50 (67,5)	24 (32,5)	
<b>Tipo histológico de Laurén</b>						
<i>intestinal</i>	12 (26,6)	33 (73,3)	0,228	36 (80)	9 (20)	0,332
<i>difuso</i>	11 (44)	14 (56)		19 (76)	6 (24)	
<i>misto/NC</i>	6 (24)	19 (76)		16 (64)	9 (36)	
<b>Padrão de cresc. (Ming)</b>						
<i>expansivo</i>	10 (25)	30 (75)	0,412	31 (77,5)	9 (22,5)	0,217
<i>infiltrativo</i>	7 (17,5)	33 (82,5)		26 (65)	14 (35)	
<b>Metástases à distância (pM)</b>						
<i>pMx</i>	26 (30)	61 (70)	0,654	65 (74,7)	22 (25,3)	0,986
<i>pM1</i>	3 (37,5)	5 (62,5)		6 (75)	2 (25)	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Qui-quadrado)  
**NA:** não avaliado

### 4.3 Avaliação da densidade microvascular linfática e sanguínea

Para a realização da quantificação da microvascularização, foram selecionados aleatoriamente 52 casos a partir da amostra inicial. Cada caso selecionado estava representado por três lâminas marcadas por CD34, D2-40 e CD105. A Tabela 9 mostra as características clínico-patológicas dos 52 casos selecionados.

**TABELA 9:** Características clínico-patológicas da amostra (N=52).

<b>Dados Clínico-patológicos</b>	<b>N = 52 (%)</b>
<b>Gênero</b>	
<i>masculino</i>	34 (65,4)
<i>feminino</i>	18 (34,6)
<b>Topografia do tumor</b>	
<i>Terço proximal</i>	8 (15,4)
<i>Terço médio</i>	3 (5,8)
<i>Terço distal</i>	29 (55,8)
<i>Terço proximal+médio</i>	1 (1,9)
<i>Terço médio+distal</i>	3 (5,8)
<i>Terço proximal+médio+distal</i>	7 (13,5)
<i>Junção esôfago-gástrica</i>	1 (1,9)
<b>Curvatura acometida</b>	
<i>pequena curvatura</i>	27 (51,9)
<i>grande curvatura</i>	4 (7,7)
<i>pequena e grande</i>	13 (25,0)
<i>NA</i>	8 (15,4)
<b>Profundidade do tumor (pT)</b>	
<i>Mucosa (pT1a)</i>	2 (3,8)
<i>Submucosa (pT1b)</i>	5 (9,6)
<i>Muscular própria (pT2a)</i>	6 (11,5)
<i>Subserosa (pT2b)</i>	4 (7,7)
<i>Serosa (pT3)</i>	33 (63,5)
<i>Invade estruturas (pT4)</i>	2 (3,8)
<b>Metástases linfonodais</b>	
<i>Não</i>	13 (25,0)
<i>Sim</i>	39 (75,0)
<b>Invasão de órgãos</b>	
<i>Negativa</i>	27 (51,9)
<i>Duodeno</i>	13 (25,0)
<i>Esôfago</i>	6 (11,5)
<i>Esôfago + duodeno</i>	3 (5,8)
<i>Outros</i>	3 (5,8)

(Continuação)	
<b>Dados Clínico-patológicos</b>	<b>N = 52 (%)</b>
<b>Tipo histológico de Laurén</b>	
<i>intestinal</i>	25 (48,1)
<i>difuso</i>	12 (23,1)
<i>misto</i>	15 (28,8)
<b>Invasão vascular linfática - HE</b>	
<i>Negativa</i>	13 (25,0)
<i>Positiva</i>	39 (75,0)
<b>Invasão vascular linfática - IHQ</b>	
<i>Negativa</i>	8 (15,4)
<i>Positiva</i>	44 (84,6)
<b>Invasão vascular sanguínea - HE</b>	
<i>Negativa</i>	28 (53,8)
<i>Positiva</i>	24 (46,2)
<b>Invasão vascular sanguínea - IHQ</b>	
<i>Negativa</i>	39 (75,0)
<i>Positiva</i>	13 (25,0)

#### 4.3.1 Contagem microvascular

A média do número de microvasos contados por campo microscópico apresentou uma variação proporcional entre os diferentes aumentos estudados considerando-se cada um dos marcadores utilizados.

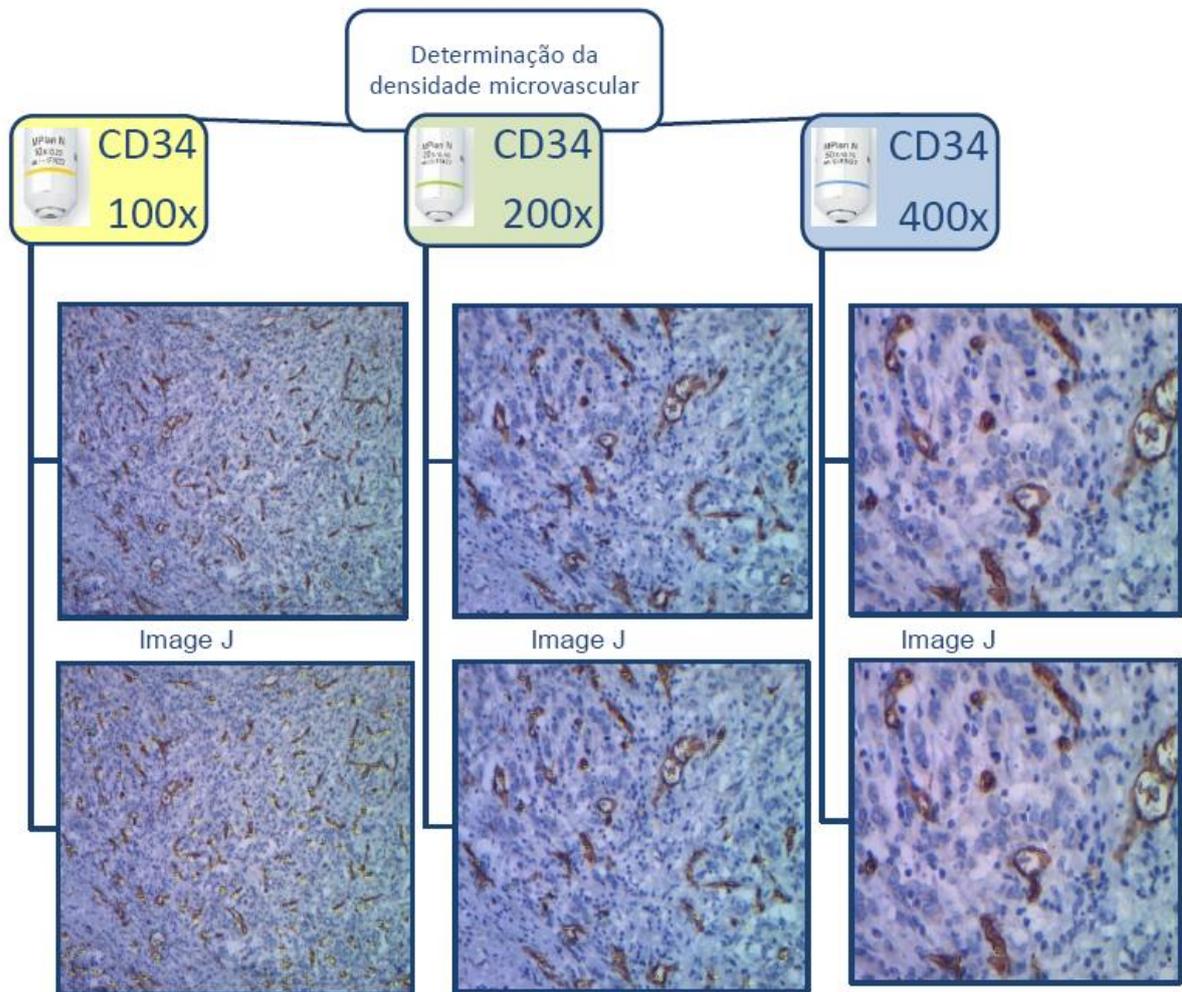
A média da contagem vascular nos 52 casos corados pelo CD34 foi de 152 microvasos por campo microscópico em aumento de 100x, 58 microvasos por campo de 200x e 20 microvasos por campo de 400x.

Em relação ao CD105, observamos as seguintes médias: 97 microvasos por campo microscópico de 100x, 41 microvasos por campo microscópico de 200x e 15 microvasos por campo microscópico de 400x.

As lâminas coradas pelo D2-40 apresentaram contagem microvascular consideravelmente menor do que as obtidas nos dois marcadores anteriores, apresentando as médias de 26 microvasos por campo microscópico de 100x, 13

microvasos por campo microscópico de 200x e 7 microvasos por campo microscópico de 400x.

A Figura 17 exemplifica a contagem vascular de um caso com o marcador CD34, nos três aumentos estudados. Os valores da contagem microvascular de todos os casos analisados estão demonstrados na Tabela 10.



**FIGURA 17:** Exemplo de caso de contagem microvascular em cada um dos aumentos utilizando o marcador CD34.

**TABELA 10:** Número médio de microvasos contados em três campos microscópicos de 52 casos analisados.

Ano	Caso	CD34	CD34	CD34	D2-40	D2-40	D2-40	CD105	CD105	CD105
		10x	20x	40x	10x	20x	40x	10x	20x	40x
2000	<b>8364.00</b>	299,5	134	54,5	27	14,33	6,67	48	16	8
2000	<b>8599.00</b>	104	38	16	16	10	4	76	25	10
2001	<b>5704.01</b>	90	32	12	23	10	6	43,5	21,5	9
2001	<b>7057.01</b>	116,67	60	25	39,33	20	11,33	105,33	51	21,33
2002	<b>308.02</b>	139	44	17	22,66	10	4,66	104,66	49,66	21
2002	<b>496.02</b>	152,33	70,66	22,33	36,33	19,66	7,66	114,33	48,66	18
2002	<b>1969.02</b>	75,66	35	20,33	26,33	13,66	10,66	75,66	37	18,66
2002	<b>2713.02</b>	56	32,33	17,66	26,33	14,33	7	141,66	63	23,33
2002	<b>2813.02</b>	186	85,66	30,33	38,66	20,33	10,33	188,33	72	21,66
2002	<b>4101.02</b>	111	40,33	13,66	26,33	19,33	12,66	62	25	8,66
2002	<b>4811.02</b>	194,33	72	23,67	31	14	7	143,67	58	19,33
2002	<b>5185.02</b>	154,33	78	31,66	20,33	9,66	6	163	66,66	26
2002	<b>5789.02</b>	135	53	17,66	37,66	19	9,66	74,66	26,33	12
2002	<b>5973.02</b>	161,66	57,66	17	26,33	11	5,66	187	67,66	20,66
2002	<b>7471.04</b>	80,33	35	16	19	12	7	40,67	25	13,33
2002	<b>7473.04</b>	186,67	66,33	21,67	30	18,67	12,67	92	47	18,33
2003	<b>1437.03</b>	192,33	61	20,33	17,33	12,33	7,33	71	34,33	11
2003	<b>3055.03</b>	115,66	49,33	17,33	37	17	8,33	69,66	39,33	16,33
2003	<b>3977.03</b>	178,66	66,33	26	37,33	14	9	165,33	85	32
2003	<b>4099.03</b>	210,66	78	23	23	11,33	6,66	115,33	49,33	17,66
2003	<b>4877.03</b>	224,33	65,66	19,33	22	11,5	9,5	187	67	19,33
2003	<b>5065.03</b>	185,33	66,33	25,33	17,67	10,67	6,33	67,33	22,67	11
2003	<b>5705.03</b>	202,33	78,67	27	37,67	15,67	8	62,67	24,67	9,33
2003	<b>5957.03</b>	124,33	44,33	15,67	15,67	5,33	3,67	110	41,67	14,33
2003	<b>6188.03</b>	154,67	51	18,33	33	15,33	7,33	106	41	12,67
2003	<b>6237.03</b>	227,67	83,67	29	24,67	10,67	5,67	131	52,5	15,5
2003	<b>8639.03</b>	160	59	17,67	20	11	5,5	59,67	34	14
2003	<b>8722.03</b>	214,67	88	29,67	27,33	13,67	7,33	125,33	71,33	24
2003	<b>9576.03</b>	246,67	99,67	31	34,67	16,67	8	195,33	75,33	25,67
2004	<b>203.04</b>	95	29	10,67	35	21,33	13,67	72	40	17
2004	<b>1080.04</b>	107	46,33	19	22,33	12,33	6,33	69	27,67	9,67
2004	<b>1992.04</b>	158,33	53,33	19	42,67	17,33	9	69,5	34	18
2004	<b>2092.04</b>	143,33	52,67	18	35	12,33	5,67	97,67	36,33	11
2004	<b>4564.04</b>	127,67	47,33	14,33	24,33	11,67	6	49	16,33	6,33
2004	<b>7631.04</b>	130	51,67	20,33	41	16,67	6,67	37,5	17	6
2004	<b>8281.04</b>	114,33	42	15	30	16	7,5	107,33	38,66	12,66
2004	<b>8470.04</b>	132,33	73	34,66	27,33	13,33	6,66	45	21,66	10,66
2004	<b>9299.04</b>	232,66	94,33	27,66	24,66	14,66	11,33	142,5	63	18
2004	<b>9385.04</b>	173,33	62,66	23,66	29,33	16,66	8	108	41,33	15,66
2004	<b>9875.04</b>	156,66	58,33	17	9,33	7,33	3,66	63,66	26,66	11,33
2004	<b>9954.04</b>	160	57,33	19,66	26	13,5	7	124,33	49,66	16,33
2005	<b>4942.05</b>	209,33	70	21	25,33	11	6,33	136	54,66	19,66

2005	<b>5138.05</b>	109,33	39,66	13,66	24,33	9,66	5,33	45,66	21,66	8
2005	<b>7306.05</b>	144,66	51,33	16	20,66	9	5	32,5	14,5	5,5
2005	<b>8080.05</b>	149,33	68,33	22,66	10,33	7,33	5,66	101	43	12
2005	<b>8513.05</b>	139	49	16	20	8	5	87,33	29,66	13,33
2005	<b>8646.05</b>	161	60,66	23,33	32,66	14	7,33	71	28,66	8,33
2006	<b>1071.06</b>	68,2	35,6	18,4	19	7,4	4,6	46,4	21,75	14,4
2006	<b>2581.06</b>	72,75	31,2	15	36,33	17,66	15	45,25	21,25	9,5
2006	<b>3330.06</b>	163	67,6	23	23,2	10,8	5,4	130,25	63,5	20,5
2006	<b>6689.06</b>	154,2	59,4	21,2	21,75	9,75	5	102,6	43,4	14,2
2006	<b>8385.06</b>	138,33	51,66	15,33	15,66	8,66	4,33	53,66	22	9,33
	<b>MÉDIA</b>	152,279	58,61208	20,69125	26,76104	13,19188	7,376667	97,71729	41,67646	15,23271

#### 4.3.2 Densidade microvascular sanguínea e linfática

Acompanhando a contagem microvascular, os valores médios de densidade microvascular expressos em número de vasos por  $\text{mm}^2$  apresentaram variação proporcional entre os marcadores utilizados e também entre os diferentes aumentos microscópicos estudados para cada um dos marcadores IHQ.

Quando estudamos a DMV nos 52 casos selecionados da amostra pelo CD34, observamos médias de 203 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 100x, 311 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 200x e 490 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 400x.

Em relação ao CD105, observamos as seguintes médias: 127 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 100x, 213 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 200x e 347 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 400x.

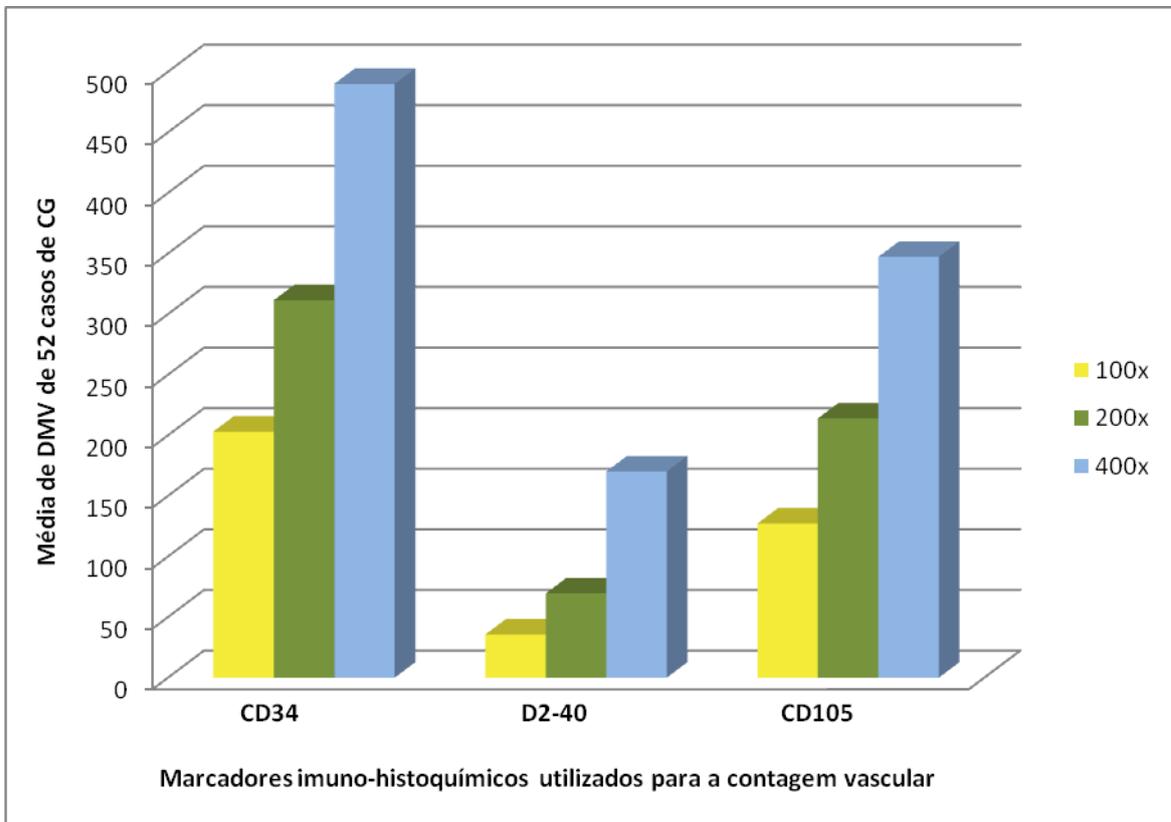
O marcador D2-40 mostrou uma DMV consideravelmente menor que os dois marcadores anteriores, apresentando médias de 35 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 100x, 69 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 200x e 170 microvasos/ $\text{mm}^2$  no aumento de 400x.

Os valores de DMV de todos os casos analisados estão demonstrados na Tabela 11. O Gráfico 2 mostra a variação da DMV média conforme o aumento microscópico estudado e os marcadores IHQ utilizados. A Figura 18 ilustra uma comparação feita entre os campos microscópicos dos aumentos estudados.

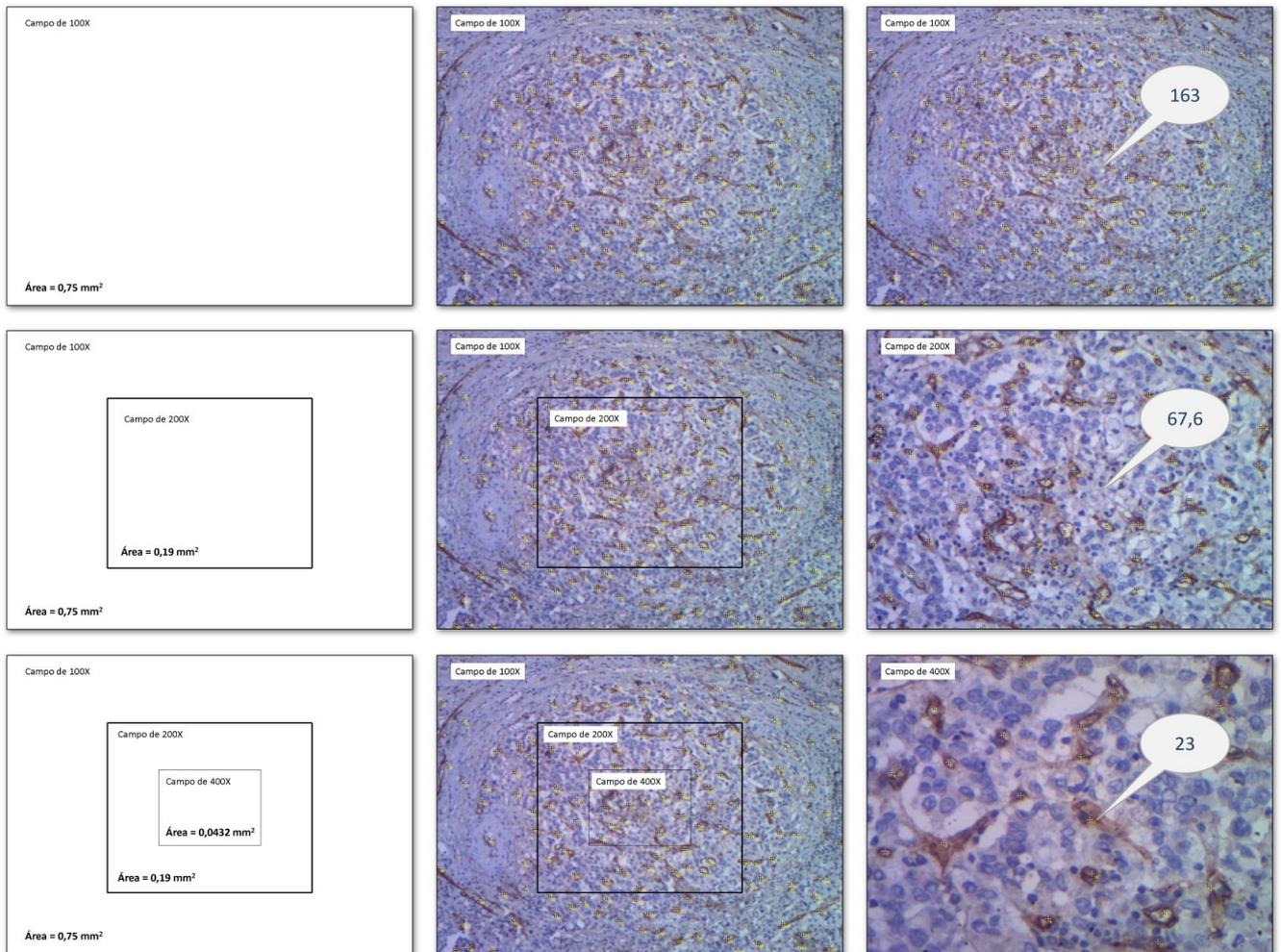
**TABELA 11:** Valores de densidade microvascular de 52 casos analisados.

Ano	Caso	CD34	CD34	CD34	D2-40	D2-40	D2-40	CD105	CD105	CD105
		100x	200x	400x	100x	200x	400x	100x	200x	400x
2000	<b>8364.00</b>	399,33	705,26	1261,57	36	75,44	154,32	64	84,21	185,18
2000	<b>8599.00</b>	138,67	200	370,37	21,33	52,63	92,59	101,33	131,58	231,48
2001	<b>5704.01</b>	120	168,42	277,78	30,67	52,63	138,89	58	113,16	208,33
2001	<b>7057.01</b>	155,55	315,79	578,7	52,44	105,16	262,34	140,44	268,42	493,83
2002	<b>308.02</b>	185,33	231,58	393,52	30,22	52,63	108,02	139,55	261,4	486,11
2002	<b>496.02</b>	203,11	371,93	516,97	48,44	103,51	177,47	152,44	256,14	416,66
2002	<b>1969.02</b>	100,89	184,21	470,68	35,11	71,93	246,91	100,89	194,73	432,1
2002	<b>2713.02</b>	74,66	170,17	408,95	35,11	75,43	162,14	188,89	331,57	540,12
2002	<b>2813.02</b>	248	450,88	702,16	51,55	107,02	239,2	251,11	378,94	501,54
2002	<b>4101.02</b>	148	212,28	316,36	35,11	101,75	293,21	82,66	131,58	200,62
2002	<b>4811.02</b>	259,11	378,95	547,84	41,33	73,68	162,04	191,55	305,26	447,53
2002	<b>5185.02</b>	205,78	410,53	733,02	27,11	50,88	138,89	217,33	350,88	601,85
2002	<b>5789.02</b>	180	278,95	408,95	50,22	100	223,76	99,55	138,6	277,78
2002	<b>5973.02</b>	215,55	303,51	393,52	35,11	57,89	131,17	249,33	356,14	478,39
2002	<b>7471.04</b>	107,11	184,21	370,37	25,33	63,16	162,04	54,22	131,58	308,64
2002	<b>7473.04</b>	248,89	349,12	501,54	40	98,24	293,21	122,67	247,37	424,38
2003	<b>1437.03</b>	256,44	321,05	470,68	23,55	64,91	169,75	94,66	180,7	254,63
2003	<b>3055.03</b>	154,22	259,65	401,23	49,33	89,47	192,9	92,89	207,02	378,08
2003	<b>3977.03</b>	238,22	349,12	601,85	49,77	73,68	208,33	220,44	447,37	740,74
2003	<b>4099.03</b>	280,89	410,52	532,41	30,66	59,65	154,32	153,78	259,65	408,95
2003	<b>4877.03</b>	299,11	345,61	447,53	29,33	60,53	219,91	249,33	352,63	447,53
2003	<b>5065.03</b>	247,11	349,12	586,42	23,55	56,14	146,6	89,78	119,3	254,63
2003	<b>5705.03</b>	269,78	414,03	625	50,22	82,46	185,18	83,55	129,82	216,05
2003	<b>5957.03</b>	165,78	233,33	362,65	20,89	28,07	84,87	146,67	219,3	331,79
2003	<b>6188.03</b>	206,22	268,42	424,38	44	80,7	169,75	141,33	215,79	293,21
2003	<b>6237.03</b>	303,55	440,35	671,3	32,89	56,14	131,17	174,67	276,31	358,8
2003	<b>8639.03</b>	213,33	310,53	408,95	26,67	57,89	127,31	79,55	178,95	324,07
2003	<b>8722.03</b>	286,22	463,16	686,73	36,44	71,93	169,75	167,11	375,44	555,55
2003	<b>9576.03</b>	328,89	524,56	717,59	46,22	87,72	185,18	260,44	396,49	594,13
2004	<b>203.04</b>	126,67	152,63	246,91	46,67	112,28	316,36	96	210,53	393,52
2004	<b>1080.04</b>	142,67	243,86	439,81	29,78	64,91	146,6	92	145,61	223,76
2004	<b>1992.04</b>	211,11	280,7	439,81	56,89	91,23	208,33	92,67	178,95	416,67
2004	<b>2092.04</b>	191,11	277,19	416,67	46,67	64,91	131,17	130,22	191,23	254,63

2004	<b>4564.04</b>	170,22	249,12	331,79	32,44	61,4	138,89	65,33	85,96	164,6
2004	<b>7631.04</b>	173,33	271,93	470,68	54,67	87,72	154,32	50	89,47	138,89
2004	<b>8281.04</b>	152,44	221,05	347,22	40	84,21	173,61	143,11	203,51	293,21
2004	<b>8470.04</b>	176,44	382,21	802,47	36,44	70,17	154,32	60	114,03	246,91
2004	<b>9299.04</b>	310,22	496,49	640,43	32,89	77,19	262,34	190	331,58	416,67
2004	<b>9385.04</b>	231,11	329,82	547,84	39,11	87,72	185,18	144	217,54	362,65
2004	<b>9875.04</b>	208,89	307,02	393,52	12,44	38,59	84,87	84,89	140,35	262,34
2004	<b>9954.04</b>	213,33	301,75	455,25	34,67	71,05	162,04	165,78	261,4	378,08
2005	<b>4942.05</b>	279,11	368,42	486,11	33,78	57,89	146,6	181,33	287,72	455,25
2005	<b>5138.05</b>	145,78	208,77	316,35	32,44	50,88	123,45	60,89	114,03	185,18
2005	<b>7306.05</b>	192,89	270,17	370,37	27,55	47,37	115,74	43,33	76,31	127,31
2005	<b>8080.05</b>	199,11	359,65	524,69	13,78	38,59	131,17	134,66	226,31	277,78
2005	<b>8513.05</b>	185,33	257,89	370,37	26,66	42,1	115,74	116,44	156,14	308,64
2005	<b>8646.05</b>	214,66	319,3	540,12	43,55	73,68	169,75	94,66	150,88	192,9
2006	<b>1071.06</b>	90,93	187,37	425,93	25,33	38,95	106,48	61,86	114,47	333,33
2006	<b>2581.06</b>	97	164,21	347,22	48,44	92,98	347,22	60,33	111,84	219,9
2006	<b>3330.06</b>	217,33	355,79	532,4	30,93	56,84	125	173,66	334,21	468,75
2006	<b>6689.06</b>	205,6	312,63	490,74	29	51,31	115,74	136,8	228,42	328,7
2006	<b>8385.06</b>	184,44	271,93	354,94	20,89	45,61	100,31	71,55	115,79	216,05
<b>MÉDIA</b>		203,0665	311,445	490,0127	35,64654	69,59327	170,124	127,2629	213,9733	347,2773



**GRÁFICO 2:** Variação da DMV média dos casos conforme o aumento microscópico estudado e os marcadores IHQ (N=52).



**FIGURA 18:** Comparação entre os campos microscópicos dos aumentos estudados e suas respectivas áreas e contagens microvasculares (coloração IHQ pelo CD34).

#### 4.3.3 Análise das diferenças entre os valores de Densidade microvascular obtidos nos três aumentos microscópicos

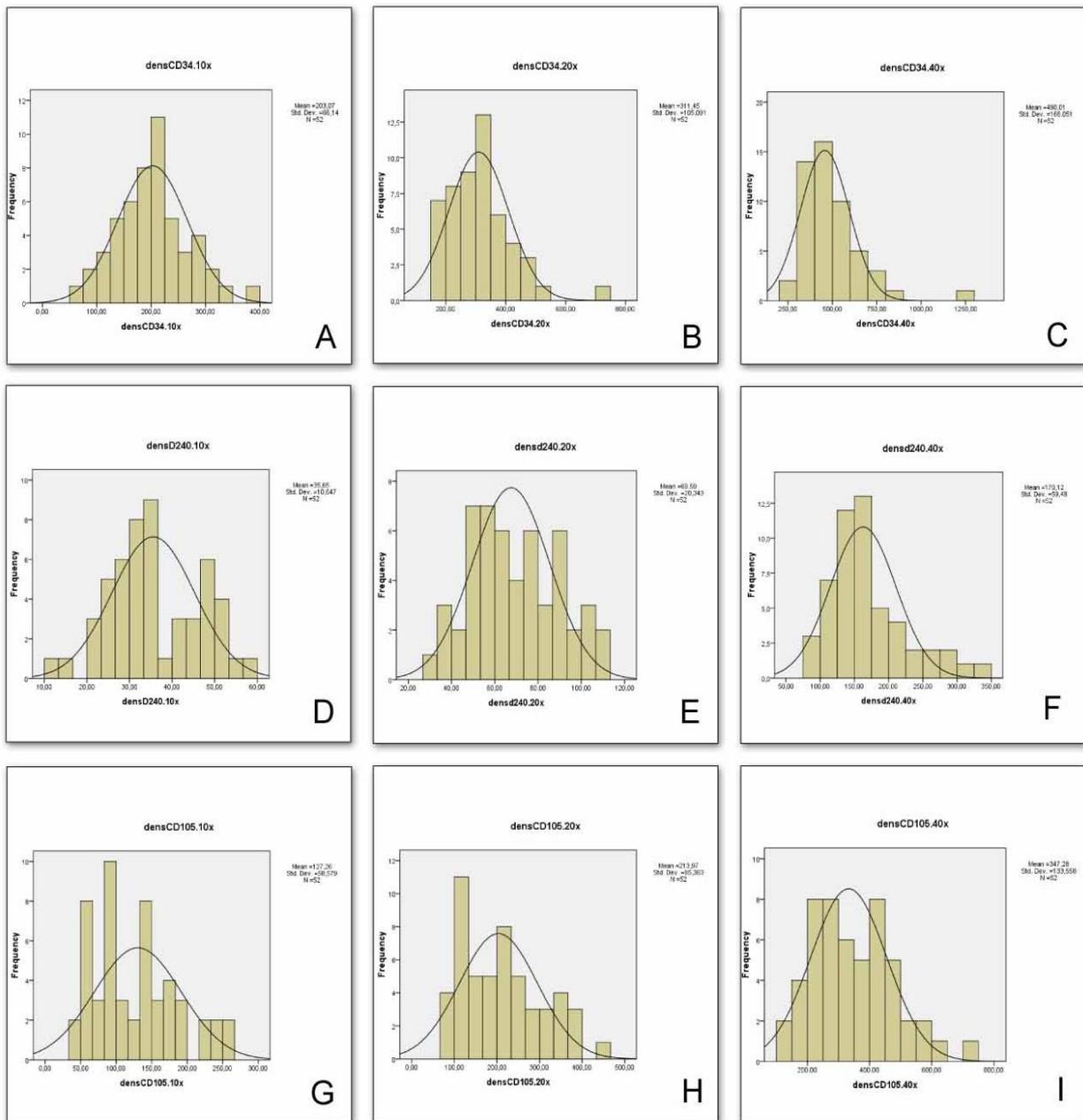
A análise de variância ANOVA demonstrou diferenças significativas entre as médias dos valores de DMV encontrados em cada aumento microscópico. Estão representados na Tabela 12 as médias dos valores de DMV para cada marcador e para cada aumento microscópico, com seus respectivos desvios-padrão e diferenças

significativas. A Figura 19 ilustra os padrões de distribuição da DMV nos três marcadores IHQ e nos três aumentos microscópicos estudados.

**TABELA 12:** Análise de variância entre as médias dos valores de DMV encontrados em cada aumento microscópico. (N=52).

<b>Marcador IHQ</b>	<b>Aumento microscópico</b>	<b>DMV média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Valor de p</b>
<b>CD34</b>	100x	203,06	66,14	<b>&lt; 0,001*</b>
	200x	311,44	105,09	
	400x	490,01	166,05	
<b>D2-40</b>	100x	35,64	10,64	<b>&lt; 0,001*</b>
	200x	69,59	20,34	
	400x	170,12	59,48	
<b>CD105</b>	100x	127,26	58,58	<b>&lt; 0,001*</b>
	200x	213,97	95,36	
	400x	347,27	133,56	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste ANOVA)



**FIGURA 19:** Histogramas representando o padrão de distribuição da densidade microvascular nos três aumentos estudados (100x, 200x, 400x) pelos três marcadores imuno-histoquímicos (CD34, D2-40, CD105). **A.** DMV CD34.100x. **B.** DMV CD34.200x. **C.** DMV CD34.400x. **D.** DMV D2-40.100x. **E.** DMV D2-40.200x. **F.** DMV D2-40.400x. **G.** DMV CD105.100x. **H.** DMV CD105.200x. **I.** DMV CD105.400x.

#### *4.3.4 Associação entre fatores prognósticos para o câncer gástrico e densidade microvascular sanguínea e linfática*

Quando comparamos os valores de DMV obtidos pelos três marcadores com outros fatores prognósticos, não foi observada relação entre DMV quantificada pelo CD34 e os parâmetros avaliados. Em relação à DMVL quantificada pelo D2-40, encontramos associação estatisticamente significativa nos aumentos de 200x e 400x com o tipo histológico de Laurén ( $p=0,011$  e  $p=0,015$ ) e no aumento de 100x com a presença de invasão de órgãos adjacentes ( $p=0,02$ ). Podemos observar ainda associação entre DMV obtida pelo CD105 com IVL quando identificada pelo método convencional de HE. Não foi observada associação entre DMV linfática ou sanguínea com os seguintes fatores prognósticos: profundidade de invasão tumoral, metástases linfonodais, IVL (IHQ) ou IVS (HE ou IHQ). Os dados estão demonstrados nas Tabelas 13, 14 e 15.

**TABELA 13:** Associação entre os parâmetros clínico-patológicos e DMV obtida em três aumentos microscópicos com CD34 (N=52)

Parâmetros Clínico-patológicos	CD34 100x			CD34 200x		CD34 400x	
	N	Média DMV	Valor de <i>p</i>	Média DMV	Valor de <i>p</i>	Média DMV	Valor de <i>p</i>
<b>Gênero</b>							
<i>masculino</i>	34	205,33	0,672	321,98	0,397	508,50	0,441
<i>feminino</i>	18	198,77		291,53		455,07	
<b>Tipo histol. de Laurén</b>							
<i>intestinal</i>	25	195,11	0,755	297,33	0,740	466,66	0,822
<i>difuso</i>	12	209,28		330,78		528,22	
<i>misto/NC</i>	15	211,35		319,49		498,35	
<b>Invasão de órgãos</b>							
<i>Negativa</i>	27	187,92	0,306	291,85	0,446	470,16	0,779
<i>Duodeno</i>	13	194,60		292,38		464,74	
<i>Esôfago</i>	6	235,22		340,93		488,16	
<i>Esôfago + duodeno</i>	3	237,48		385,38		532,40	
<i>Outros</i>	3	277,25		437,42		739,45	
<b>Padrão de cresc. (Ming)</b>							
<i>expansivo</i>	23	192,80	0,543	299,00	0,718	468,19	0,910
<i>infiltrativo</i>	25	209,21		321,21		507,93	
<b>Profundidade do tumor</b>							
<i>Precoce</i>	7	224,12	0,228	349,62	0,137	536,81	0,117
<i>Avançado</i>	45	199,79		305,50		482,73	
<b>Metástases linfonodais</b>							
<i>Não</i>	13	206,93	0,453	314,30	0,824	482,54	0,899
<i>Sim</i>	39	201,77		310,49		492,50	
<b>IVL – HE</b>							
<i>Não</i>	13	212,37	0,375	315,92	0,800	481,95	0,857
<i>Sim</i>	39	199,96		309,95		492,69	
<b>IVL – IHQ</b>							
<i>Não</i>	8	225,77	0,156	329,16	0,417	504,43	0,424
<i>Sim</i>	44	198,93		308,22		487,39	
<b>IVS – HE</b>							
<i>Não</i>	28	204,58	0,762	311,64	0,847	483,51	0,713
<i>Sim</i>	24	201,29		311,21		497,58	
<b>IVS – IHQ</b>							
<i>Não</i>	39	204,64	0,941	316,22	0,841	502,94	0,540
<i>Sim</i>	13	198,34		297,11		451,21	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney U)

# diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Kruskal-Wallis)

**DMV:** densidade microvascular

**IVL:** invasão vascular linfática

**IVS:** invasão vascular sanguínea

**HE:** hematoxilina e eosina

**IHQ:** imuno-histoquímica

**TABELA 14:** Associação entre os parâmetros clínico-patológicos e DMV obtida em três aumentos microscópicos com D2-40 (N=52).

Parâmetros Clínico-patológicos	D2-40 100x			D2-40 200x		D2-40 400x	
	N	Média DMV	Valor de <i>p</i>	Média DMV	Valor de <i>p</i>	Média DMV	Valor de <i>p</i>
<b>Gênero</b>							
<i>masculino</i>	34	36,89	0,160	72,86	0,056	178,37	0,098
<i>feminino</i>	18	33,28		63,41		154,53	
<b>Tipo histol. de Laurén</b>							
<i>intestinal</i>	25	38,52	0,053	78,03	<b>0,011#</b>	187,50	<b>0,015#</b>
<i>difuso</i>	12	36,14		67,09		170,39	
<i>misto/NC</i>	15	30,45		57,52		140,94	
<b>Invasão de órgãos</b>							
<i>Negativa</i>	27	35,07	<b>0,020#</b>	69,79	0,144	167,26	0,356
<i>Duodeno</i>	13	43,21		80,29		194,38	
<i>Esôfago</i>	6	29,61		57,49		161,65	
<i>Esôfago + duodeno</i>	3	26,96		57,30		138,88	
<i>Outros</i>	3	28,73		57,89		138,88	
<b>Padrão de cresc. (Ming)</b>							
<i>expansivo</i>	23	37,63	0,134	72,47	0,252	170,15	0,347
<i>infiltrativo</i>	25	33,08		66,35		165,83	
<b>Profundidade do tumor</b>							
<i>Precoce</i>	7	41,39	0,123	77,42	0,249	187,93	0,188
<i>Avançado</i>	45	34,75		68,37		167,35	
<b>Metástases linfonodais</b>							
<i>Não</i>	13	39,24	0,148	72,87	0,447	167,08	0,696
<i>Sim</i>	39	34,44		68,50		171,13	
<b>IVL – HE</b>							
<i>Não</i>	13	35,00	0,992	70,64	0,590	181,63	0,156
<i>Sim</i>	39	35,86		69,24		166,28	
<b>IVL – IHQ</b>							
<i>Não</i>	8	34,83	0,819	67,54	0,790	165,41	0,790
<i>Sim</i>	44	35,79		69,96		170,98	
<b>IVS – HE</b>							
<i>Não</i>	28	36,11	0,762	69,71	0,876	180,08	0,278
<i>Sim</i>	24	35,10		69,45		158,50	
<b>IVS – IHQ</b>							
<i>Não</i>	39	36,08	0,519	70,83	0,485	174,20	0,374
<i>Sim</i>	13	34,34		65,86		157,88	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney U)

# diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Kruskal-Wallis)

**DMV:** densidade microvascular

**IVL:** invasão vascular linfática

**IVS:** invasão vascular sanguínea

**HE:** hematoxilina e eosina

**IHQ:** imuno-histoquímica

**TABELA 15:** Associação entre os parâmetros clínico-patológicos e DMV obtida em três aumentos microscópicos com CD105 (N=52).

Parâmetros Clínico-patológicos	CD105 100x			CD105 200x		CD105 400x	
	N	Média DMV	Valor de p	Média DMV	Valor de p	Média DMV	Valor de p
<b>Gênero</b>							
<i>masculino</i>	34	134,62	0,222	229,25	0,211	364,87	0,299
<i>feminino</i>	18	113,35		185,10		314,04	
<b>Tipo histol. de Laurén</b>							
<i>intestinal</i>	25	137,38	0,358	227,36	0,359	362,18	0,333
<i>difuso</i>	12	112,96		194,91		323,64	
<i>misto/NC</i>	15	121,82		206,89		341,33	
<b>Invasão de órgãos</b>							
<i>Negativa</i>	27	123,04	0,149	214,24	0,077	353,80	0,470
<i>Duodeno</i>	13	115,10		193,55		330,60	
<i>Esôfago</i>	6	177,04		287,92		395,25	
<i>Esôfago + duodeno</i>	3	155,55		246,19		362,65	
<i>Outros</i>	3	90,07		119,88		249,48	
<b>Padrão de cresc. (Ming)</b>							
<i>expansivo</i>	23	138,99	0,143	232,28	0,137	366,46	0,239
<i>infiltrativo</i>	25	117,58		194,48		325,78	
<b>Profundidade do tumor</b>							
<i>Precoce</i>	7	136,50	0,453	259,90	0,208	427,68	0,217
<i>Avançado</i>	45	125,82		206,82		334,76	
<b>Metástases linfonodais</b>							
<i>Não</i>	13	147,80	0,166	259,85	0,074	408,05	0,095
<i>Sim</i>	39	120,41		198,68		327,01	
<b>IVL – HE</b>							
<i>Não</i>	13	146,27	0,142	264,64	<b>0,033*</b>	419,63	<b>0,036*</b>
<i>Sim</i>	39	120,92		197,08		323,15	
<b>IVL – IHQ</b>							
<i>Não</i>	8	134,88	0,454	256,58	0,196	420,52	0,205
<i>Sim</i>	44	125,87		206,22		333,96	
<b>IVS – HE</b>							
<i>Não</i>	28	130,47	0,660	226,97	0,247	368,60	0,247
<i>Sim</i>	24	123,51		198,81		322,39	
<b>IVS – IHQ</b>							
<i>Não</i>	39	134,18	0,157	226,06	0,131	365,04	0,113
<i>Sim</i>	13	106,49		177,69		293,97	

\* diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney U)

# diferença entre os valores estatisticamente significativa (teste Kruskal-Wallis)

**DMV:** densidade microvascular

**IVL:** invasão vascular linfática

**IVS:** invasão vascular sanguínea

**HE:** hematoxilina e eosina

**IHQ:** imuno-histoquímica

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, o grupo de 95 pacientes estudados refletiu o perfil geralmente descrito na literatura para o CG quanto às seguintes características: a maioria dos pacientes era do sexo masculino (65,3%), com média de idade de 65 anos, topografia tumoral predominante no terço distal do estômago (57,9%) e tipo histológico mais frequente correspondendo ao tipo intestinal de Laurén (47,4%) (9). Seguindo a mesma tendência, a faixa etária dos pacientes acometidos pelos tumores do tipo difuso de Laurén se mostrou significativamente mais jovem do que aquela observada no tipo intestinal ( $p=0,04$ ) (9). Essa característica peculiar das neoplasias do tipo difuso está bem estabelecida e denota as diferenças de sua etiopatogenia, geralmente associada a fatores genéticos, em relação às neoplasias do tipo intestinal, mais influenciadas por fatores ambientais, tais como dieta e infecção por *H. pylori*. Via de regra, as doenças associadas às alterações genéticas tendem a se manifestar mais precocemente do que aquelas relacionadas a fatores ambientais. O grupo dos tumores do tipo misto/NC de Laurén, não mostrou diferença significativa em relação à idade dos pacientes. Esse achado pode estar ligado ao fato de que o tipo misto de Laurén apresenta aspectos semelhantes ao CG de ambos os tipos intestinal e difuso (4).

Em nosso estudo, 53,7% dos casos de CG já se encontravam, por ocasião do diagnóstico, no estágio pT3 de profundidade tumoral, corroborando os dados da literatura que indicam que a maioria dos diagnósticos em nosso meio é feita tardiamente, já na fase avançada da doença (9). Destaca-se, ainda, que mais da metade dos pacientes (64,2%) já apresentava metástases linfonodais no momento do diagnóstico.

A presença de IVL e IVS no CG tem sido demonstrada em diversos estudos, os quais exibem grande variabilidade em sua detecção: entre 7,2% a 86% (61, 65, 79, 126-128). Essa ampla faixa de variação dos resultados pode ser explicada pela diferença entre as populações estudadas e também pelos diferentes métodos utilizados por esses autores para a avaliação da invasão vascular: coloração de HE ou IHQ com marcadores endoteliais específicos. Três exemplos mais consistentes da discrepância dos resultados em relação ao método utilizado são os trabalhos de Arigami *et al.*, Sako *et al.* e Yonemura *et al.* Todos eles relatam taxas mais elevadas de detecção de IVL à IHQ, quando comparada à coloração pela HE, reforçando assim o seu papel na análise da invasão vascular no CG (75, 120, 123).

Ao compararmos a detecção de IVL em cortes sequenciais pelos métodos utilizados em nosso trabalho, verificamos que esta foi superior quando avaliada pela IHQ. A presença de IVL foi detectada em 61 casos ao HE e em 66 casos pela IHQ. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ao Teste de McNemar ( $p=0,38$ ).

A avaliação de IVL ao HE está sujeita a equívocos por não ser capaz de distinguir artefatos de retração ao redor de glândulas, ou agrupamentos de células neoplásicas, de invasão vascular verdadeira. Em algumas ocasiões, os êmbolos neoplásicos preenchem totalmente o lúmen vascular, impossibilitando a sua identificação sem a marcação específica do endotélio linfático. Resultados falso-positivos podem ocorrer ainda ao HE se a presença de IVS for interpretada erroneamente como IVL. Essas discrepâncias foram também observadas em outras séries de estudos sobre CG (75, 120, 123). Embora outros trabalhos também tenham utilizado o método IHQ para o diagnóstico da invasão vascular, somente estes autores aferiram a eficácia deste método para a detecção de IVL, quando

comparada à coloração de rotina pela HE. É interessante ressaltar que nosso estudo, além de comparar os dois métodos de detecção de invasão vascular, utilizou cortes seriados e sequenciais para a sua avaliação.

A correlação entre a variável IVL com a presença de metástases foi estatisticamente significativa, tanto na avaliação pelo método de rotina (HE), quanto pelo método IHQ ( $p=0,001$ ). Esse dado é corroborado pela literatura, que afirma ser a IVL detectada no tumor primário um fenômeno essencial para a ocorrência de metástases linfonodais (70). Portanto, podemos inferir que a presença de IVL é maior em paciente com metástases linfonodais do que naqueles nos quais os linfonodos examinados foram negativos.

Nossos resultados mostram que a IVS avaliada por ambos os métodos se correlacionou positivamente com a presença de metástases linfonodais, diferentemente do que foi demonstrado por alguns autores, que não encontraram associação significativa de IVS com a presença de metástases linfonodais (54). É interessante assinalar que embora aqueles autores tenham analisado um grande número de casos, trata-se de estudo retrospectivo com revisão de dados que incluiu apenas CG precoces, o que justifica a baixa ocorrência de metástases linfonodais e de IVS.

A presença de metástases linfonodais é considerada o fator de maior influência no prognóstico dos pacientes, estando relacionada à presença de invasão vascular (51). Estudos retrospectivos sobre CG mostram que a presença de IVL e IVS detectadas pelo método IHQ está relacionada à recorrência da neoplasia em pacientes com e sem metástases linfonodais e também está relacionada à menor sobrevida (74, 120, 129).

Em nosso estudo, obtivemos correlação entre a presença de metástases linfonodais e as demais características clínico-patológicas dos pacientes. Dentre os fatores avaliados neste trabalho, a profundidade tumoral (quando comparado o CG em seus estágios precoce e avançado), a classificação histológica de Laurén e a invasão de órgãos por continuidade (esôfago e duodeno) foram as características significativamente relacionadas à presença de metástases linfonodais.

A classificação histológica de Laurén tem significado prognóstico no CG, sendo o tipo intestinal o que apresenta evolução mais favorável. Os relatos na literatura indicam que os tipos difuso e misto/NC de Laurén são considerados de pior prognóstico, quando comparados aos tumores do tipo intestinal (130). As neoplasias do tipo difuso estão associadas a maior potencial infiltrativo na parede gástrica e maior tendência à disseminação por metástases. Paradoxalmente, os dados obtidos em nosso trabalho registram que os tumores do tipo difuso apresentaram menor proporção de acometimento linfonodal que os demais tipos de CG da classificação de Laurén. Quando foram excluídos os tumores do tipo intestinal da análise, observamos que os tumores do tipo misto/NC mostraram um número de metástases significativamente maior do que os difusos ( $p=0,017$ ). Entretanto, nossos resultados podem ter sofrido a interferência de um viés relacionado à profundidade de invasão nas camadas da parede gástrica. Os tumores do tipo difuso precoces correspondiam a 32% dos casos, enquanto apenas 8% das neoplasias do tipo misto/NC eram precoces.

Diferentes estudos na literatura demonstraram correlação entre a presença de invasão vascular e as características clínico-patológicas dos pacientes com CG, também observadas neste trabalho. Os fatores clínico-patológicos relacionados à presença de IVL foram: topografia do tumor no terço distal do estômago, tipos

macroscópicos II, III e IV de Borrmann, invasão de órgãos por continuidade e profundidade tumoral. Em contrapartida, a presença de IVS correlacionou-se apenas com a profundidade tumoral quando comparado o CG em seus estágios precoce e avançado.

Neste estudo, as neoplasias precoces exibiram menor acometimento linfonodal ( $p=0,001$ ) e menos IVL ( $p=0,001$ ) e IVS ( $p=0,007$ ) detectadas pela IHQ, quando comparadas às neoplasias avançadas. O conceito de CG precoce aplica-se às neoplasias que exibem infiltração das camadas mais superficiais da parede gástrica, ou seja, das camadas mucosa ou submucosa. É consenso que nos casos de CG precoce, há menor probabilidade de ocorrência de invasão neoplásica em vasos sanguíneos e linfáticos. Entretanto, estudos sobre a densidade da rede linfática 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 (75).

O risco de metástases linfonodais no CG precoce intramucoso é de apenas 3,2%, atingindo aproximadamente 19,2% quando há invasão da submucosa (64). Até o presente momento, não há nenhuma modalidade de exame de imagem capaz de avaliar corretamente a presença de metástases linfonodais no CG. Devido a este fato, o estadiamento linfonodal do CG precoce ainda depende da avaliação de algumas características tumorais específicas, que estão relacionadas à maior ocorrência de metástases linfonodais, a saber: profundidade de infiltração do tumor na parede gástrica, tamanho do tumor acima de 2,0 cm, classificação histológica de Laurén e IVL. Destaca-se que, dentre estes fatores, a presença de envolvimento linfático é o fator preditivo mais significativo para a ocorrência de metástases linfonodais (54).

Segundo o consenso para tratamento (*Treatment Guidelines*) do CG da JGCA, a ressecção endoscópica sem linfadenectomia se restringe aos casos de carcinomas intramucosos bem diferenciados e que medem menos que 20 mm de maior dimensão (46). A gastrectomia com linfadenectomia estaria indicada nos carcinomas intramucosos pouco diferenciados, com dimensões maiores que 20 mm ou em carcinomas invasores da submucosa. Entretanto, esses critérios são bastante rígidos e podem resultar em certo número de cirurgias desnecessárias.

Gotoda et al. Em 2000, propuseram critérios expandidos, ou mais flexíveis, para o tratamento endoscópico do CG precoce combinando as seguintes variáveis: tipo histológico, invasão angiolinfática, ulceração e tamanho do tumor (56). Esse trabalho possibilitou a ampliação do universo de pacientes com CG precoce que potencialmente também poderiam ser elegíveis para ressecção endoscópica do tumor, até mesmo com invasão da submucosa.

Os achados da revisão sistemática de 45 trabalhos com metanálise dos resultados, publicada por Kwee e Kwee, em 2008, incluíram a avaliação de diversas variáveis associadas significativamente com a presença de metástases linfonodais no CG precoce (64). Para o CG intramucoso foram observadas as seguintes características relevantes: idade abaixo de 57 anos, localização tumoral no terço médio do estômago, maiores dimensões tumorais, tipo macroscópico deprimido (SJED), ulceração, tipo difuso de Laurén e presença de IVL. Quanto ao CG submucoso as variáveis mais associadas a metástases linfonodais foram pacientes do sexo feminino, localização tumoral no terço distal do estômago, maiores dimensões tumorais, neoplasias pouco diferenciadas, profundidade da invasão da submucosa, vascularização tumoral aumentada, IVL e IVS.

A DMV é um parâmetro promissor para a avaliação do prognóstico em diferentes neoplasias (122). O método de determinação da DMV proposto originalmente por Weidner e colaboradores em 1991, estudando o câncer de mama, utilizava o aumento de 200x para a contagem vascular (109). Entretanto, estudos posteriores envolvendo DMV em outras neoplasias, inclusive no CG, utilizaram variações não padronizadas do método, como aumento de 400x, produzindo resultados pouco consistentes e problemáticos em termos de comparação (106, 114, 116, 124). Alguns desses trabalhos também falharam em relatar seus resultados de forma mais objetiva com a unidade própria da DMV, que seria o número de microvasos/mm<sup>2</sup>. Nestes trabalhos, observa-se ainda tendência de descrição da DMV como número de vasos por campo microscópico avaliado. Esse parâmetro utilizado não é exatamente confiável, uma vez que existe variação significativa da área de campo entre microscópios de marcas e modelos diferentes. Assim, os dados registrados na literatura são díspares e, portanto, inconsistentes para permitir uma conclusão sobre quais valores de DMV seriam considerados de risco para metástases ou preditivos de pior prognóstico.

Ao analisarmos nossos resultados, podemos observar que a média dos valores de DMV da amostra, expressos em número de vasos por mm<sup>2</sup>, apresentou variação proporcional entre os diferentes aumentos microscópicos avaliados. Observamos que a DMV média calculada para o aumento de 100x foi menor que para o aumento de 200x que, por sua vez, foi menor que para o aumento de 400x. Esse fato ocorreu de forma proporcional e semelhante em relação aos três marcadores IHQ estudados. Podemos interpretar essa variação como resultado de um detalhamento melhor da imagem microscópica oferecido pelos campos de maior aumento, facilitando a identificação dos vasos marcados. Talvez, por esse motivo,

os microvasos identificados sejam mais numerosos em relação à área no aumento de 400x que no aumento de 200x.

Em relação aos marcadores IHQ estudados, o valor médio de DMVL dos nossos casos foi consideravelmente menor que os valores de DMVS obtidos tanto pelo CD34 quanto pelo CD105. Essa diferença é consistente com os resultados de outros dois trabalhos, em alguns aspectos semelhantes ao nosso, que estudaram a DMV simultaneamente por marcadores do endotélio linfático e sanguíneo em séries de CG (65, 102).

A avaliação de DMVS usando CD34 e CD105 no CG mostrou padrões distintos de expressão entre os dois marcadores vasculares. Assim como já havia sido relatado por Ding e colaboradores em 2006, a contagem microvascular pela IHQ com o CD105 é menor que a avaliada pelo CD34 (114).

Ao tentarmos comparar os valores médios de DMVL e DMVS encontrados em nosso trabalho com os resultados de outros estudos disponíveis na literatura, encontramos uma ausência de padronização para o cálculo da DMV. Por exemplo, a contagem microvascular de nossos casos pelo CD34 resultou em uma média de 57,71 microvasos por campo de 200x e 20,54 microvasos por campo de 400x. Esses valores são um pouco maiores que os encontrados nas séries anteriores (65, 116, 122). Apenas dois trabalhos analisados mostram valores semelhantes aos nossos (102, 117). Podemos perceber que, apesar de relatarem o valor da contagem microvascular por campo microscópico, frequentemente não encontramos a definição da área em milímetros quadrados deste campo microscópico utilizado para a contagem microvascular nesses relatos.

Em relação à densidade microvascular linfática, a literatura é bem mais escassa e demonstra contagem microvascular realizada apenas no aumento

microscópico de 200x. Talvez essa escolha se justifique pelo fato dos vasos linfáticos serem mais amplos, com lúmen mais dilatado que os vasos sanguíneos, necessitando-se, assim, de magnificação mais panorâmica (101). A nossa média de vasos linfáticos contados por campo de 200x foi semelhante às médias encontradas em duas outras séries de CG (74, 102).

Entretanto, ainda não identificamos na literatura estudos comparativos de DMV que tenham utilizado diferentes aumentos microscópicos e diferentes marcadores de angiogênese e linfangiogênese no CG, como foi feito no presente estudo. Nosso trabalho avaliou a DMV utilizando três marcadores IHQ para endotélio vascular (um linfático e dois sanguíneos), em três aumentos microscópicos diferentes, aplicando o método padronizado por Weidner (109).

Em nosso estudo, não obtivemos associação estatisticamente significativa entre DMV quantificada pelo CD34 e outros fatores prognósticos. Nossos resultados não conseguiram reproduzir a relação encontrada por outros autores entre DMV e outras características no CG e em outras neoplasias, tais como tipo histológico de Laurén, invasão serosa, invasão vascular, metástases linfonodais e a distância (107, 116, 117, 122, 131, 132). A amostra reduzida pode ter exercido influência em nossos resultados. Além disso, a expressão de CD34 pode ser considerada como um indicador da neovascularização em vez correlacionar diretamente com a presença de metástases (117).

Quando avaliada pelo marcador CD105, houve diferença significativa entre a DMV média dos casos com e sem IVL detectada ao HE. Como podemos identificar casos de falso-positivo e falso-negativo para IVL após o estudo IHQ, a avaliação de IVL apenas pela HE mostrou acurácia significativamente inferior. Portanto, a associação com DMV quantificada pelo CD105 pode ter sido causada por um viés.

A DMV linfática quantificada pelo marcador D2-40 esteve associada a presença de invasão de outros órgãos (duodeno e esôfago) quando avaliada no aumento de 100x e ao tipo histológico de Laurén nos aumentos de 200x e 400x. Essas características são fatores já estabelecidos e associados a pior prognóstico em pacientes com CG (42). No entanto, os estudos disponíveis não pesquisaram ou não encontraram relação entre os fatores mencionados e DMV linfática. Outros autores demonstraram relação entre DMV linfática e profundidade tumoral, idade, IVL, IVS e metástases linfonodais (74, 124, 133). Uma razão pela qual existem diferenças entre os nossos resultados e os estudos anteriores é devido ao fato de que o número de vasos linfáticos tende a diminuir na porção central do tumor primário, podendo repercutir na determinação do valor de DMV (101).

Ressaltamos ainda que diversos autores também não encontraram relação significativa entre DMV linfática e sanguínea com a presença de metástases linfonodais (65, 114, 132).

Tumores com maior valor de DMV linfática e sanguínea mostram menor sobrevida após a cirurgia (74, 114, 116, 122, 124). No entanto, ainda não foi estabelecido qual seria o aumento microscópico mais adequado para a contagem vascular e com o melhor valor prognóstico no CG.

A maioria dos fatores prognósticos e preditivos do CG pode ser perfeitamente avaliada por meio de exames propedêuticos no pré-operatório: endoscopia digestiva acompanhada de biópsia e métodos de imagem, como tomografia computadorizada e ultrassom endoscópico. Entretanto, tanto a presença ou ausência de IVL e IVS quanto a DMV linfática e sanguínea só podem ser avaliadas pelo estudo anatomopatológico, após a ressecção cirúrgica do tumor. O estudo imuno-histoquímico com a marcação do endotélio vascular linfático e sanguíneo contribui

possibilitando a determinação da DMV e tornando essa avaliação mais refinada no que diz respeito a IVL e IVS.

## 6 CONCLUSÃO

- ✓ 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;
- ✓ A presença de invasão vascular linfática e sanguínea, avaliada pela coloração de HE e pela IHQ, está relacionada à presença de metástases linfonodais;
- ✓ A presença de invasão vascular linfática está relacionada a outros fatores de pior prognóstico no CG, como a localização do tumor no terço distal do estômago, os tipos macroscópicos II, III e IV de Borrmann, a invasão de órgãos por continuidade (esôfago e duodeno) e a profundidade de infiltração tumoral além da submucosa (CG avançado), refletindo provavelmente o seu potencial metastático e comportamento agressivo;
- ✓ A profundidade de infiltração tumoral além da submucosa (CG avançado) está associada à presença de invasão vascular sanguínea;
- ✓ Existe diferença entre os valores de DMV linfática e sanguínea no CG dependendo do método de quantificação utilizado, principalmente em relação ao aumento do campo microscópico e à área deste campo, sendo que quanto maior a magnificação, maior o número de vasos identificados e maior o valor da DMV;
- ✓ A DMV sanguínea quantificada pelo marcador CD34 foi maior que a DMV sanguínea quantificada pelo CD105 em uma mesma série de casos de CG;
- ✓ A DMV linfática foi consideravelmente menor que a DMV sanguínea no CG;
- ✓ Não observamos associação estatística entre DMV quantificada pelo marcador pan-endotelial CD34 e outros fatores prognósticos;

- ✓ A DMV linfática quantificada pelo marcador D2-40 no aumento de 100x está associada a presença de invasão de outros órgãos (duodeno e esôfago);
- ✓ A DMV linfática quantificada pelo marcador D2-40 nos aumentos de 200x e 400X está associada ao tipo histológico de Laurén;
- ✓ A DMV quantificada pelo marcador CD105 nos aumentos de 200x e 400X está associada à presença de invasão vascular linfática apenas avaliada ao exame convencional de HE.

## REFERÊNCIAS

1. Coleman M, Estève J, Damiecki P, Arslan A, Renard H. Trends in cancer incidence and mortality. IARC Sci Publ. 1993 (121):1-806.
2. Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, Belli J, Stemmermann G. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. Semin Oncol. 1996 Jun;23(3):292-306.
3. Aaltonen LA, Hamilton SR, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon Oxford: IARC Press; Oxford University Press (distributor; 2000. 314 p).
4. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31-49.
5. Laurén P. Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. Scand J Gastroenterol Suppl. 1991;180:160-4.
6. Carneiro F. Classification of gastric carcinomas. Curr Diagn Pathol. 1997 March 1997;4(1):51-9.
7. Ming S. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. Cancer. 1977 Jun;39(6):2475-85.
8. Luebke T, Baldus S, Grass G, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes H, et al. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. World J Surg. 2005 Nov;29(11):1422-8.
9. Lemes LAO, Neunschwander LcC, Matta LAC, Osório Filho J, Soares PCM, Cabral MMDA, et al. Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2003;39(1):9.
10. Robert M, Lamps L, Lauwers G. Recommendations for the reporting of gastric carcinoma. Hum Pathol. 2008 Jan;39(1):9-14.
11. Kim J, Lee J, Kim S, Yu H, Yang H. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10 783 patients with gastric cancer. Gastric Cancer. 1998 Mar;1(2):125-33.
12. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition -. Gastric Cancer. 1998 Dec;1(1):10-24.
13. Moreaux J, Bougaran J. Early gastric cancer. A 25-year surgical experience. Ann Surg. 1993 Apr;217(4):347-55.

14. Borrmann R. Geschwulste des Magens und Duodenums. In: Henke F, Lubarsch O, Rössle R, editors. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. 4. Berlin,,: Springer-Verlag; 1926. p. 865.
15. Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. *Lancet*. 2003 Jul 26;362(9380):305-15.
16. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol*. 2009;472:467-77.
17. Forman D, Burley V. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20(4):633-49.
18. Correa P, Piazuelo M, Camargo M. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg*. 2006;95(4):218-24.
19. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. [Internet]. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2009. Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>.
20. Laurén P, Nevalainen T. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer*. 1993 May;71(10):2926-33.
21. Kamangar F, Dores G, Anderson W. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006 May;24(14):2137-50.
22. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*. 1975 Jul;2(7924):58-60.
23. Joossens J, Geboers J. Nutrition and gastric cancer. *Nutr Cancer*. 1981;2(4):250-61.
24. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992 Dec;52(24):6735-40.
25. Joossens J, Hill M, Elliott P, Stamler R, Lesaffre E, Dyer A, et al. Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol*. 1996 Jun;25(3):494-504.
26. Marshall B, Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984 Jun;1(8390):1311-5.
27. Taylor D, Blaser M. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*. 1991;13:42-59.

28. Blaser M, Chyou P, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res.* 1995 Feb;55(3):562-5.
29. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1995;19 Suppl 1:S37-43.
30. Warren J. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am.* 2000 Sep;29(3):705-51.
31. Queiroz D, Mendes E, Rocha G, Oliveira A, Oliveira C, Magalhães P, et al. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer.* 1998 Oct;78(2):135-9.
32. Cabral M, Oliveira C, Mendes C, Guerra J, Queiroz D, Rocha G, et al. Gastric epithelial cell proliferation and *cagA* status in *Helicobacter pylori* gastritis at different gastric sites. *Scand J Gastroenterol.* 2007 May;42(5):545-54.
33. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007 Aug;133(2):659-72.
34. Ming S. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer.* 1998 Dec;1(1):31-50.
35. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ.* 2004 (157):327-49.
36. Correa P, Piazuolo M. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis.* 2008 Jul;40(7):490-6.
37. Wilson K, Crabtree J. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology.* 2007 Jul;133(1):288-308.
38. Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor D. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol.* 1996 May;20(4):833-42.
39. Cabral MMDA, Marino M, Oliveira CA, Mendes CC, Costa Adriana CF, Guerra J, et al. *Helicobacter pylori* associated gastritis: topographical pattern, associated diseases and correlation with *cagA* status. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2006;42(1):51-9.
40. Rodrigues M, Nogueira A, Rocha P. Diagnóstico, classificação e estadiamento do carcinoma gástrico: correlação clínico-patológica com ênfase na classificação histológica de Lauren. Estudo prospectivo em 90 pacientes operados. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais - TESE.

41. Jentschura D, Winkler M, Strohmeier N, Rumstadt B, Hagmüller E. Quality-of-life after curative surgery for gastric cancer: a comparison between total gastrectomy and subtotal gastric resection. *Hepatogastroenterology*. 1997;44(16):1137-42.
42. Nogueira AMMF, Silva ACS, Paiva EB, Carvalho SP, Salles PGO. Distal gastric carcinoma with duodenal invasion. Histopathologic study and review of the literature. *Arq Gastroenterol*. 2000;37(3):168-73.
43. Cimerman M, Repse S, Jelenc F, Omejc M, Bitenc M, Lamovec J. Comparison of Lauren's, Ming's and WHO histological classifications of gastric cancer as a prognostic factor for operated patients. *Int Surg*. 1994;79(1):27-32.
44. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. New York: J. Wiley.
45. Greene FL, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer-Verlag; 2002. xiv, 421 p.
46. Nakajima T. Gastric cancer treatment guidelines in Japan. *Gastric Cancer*. 2002;5(1):1-5.
47. Shimada Y. JGCA (The Japan Gastric Cancer Association). Gastric cancer treatment guidelines. *Jpn J Clin Oncol*. 2004 Jan;34(1):58.
48. Furukawa H, Imamura H, Kodera Y. The role of surgery in the current treatment of gastric carcinoma. *Gastric Cancer*. 2002;5 Suppl 1:13-6.
49. Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Yamamura Y, Misawa K, Ohashi N, et al. The number of metastatic lymph nodes is a significant risk factor for bone metastasis and poor outcome after surgery for linitis plastica-type gastric carcinoma. *World J Surg*. 2008 Sep;32(9):2015-20.
50. Siewert J, Böttcher K, Stein H, Roder J. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg*. 1998 Oct;228(4):449-61.
51. Yokota T, Ishiyama S, Saito T, Teshima S, Narushima Y, Murata K, et al. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand J Gastroenterol*. 2004 Apr;39(4):380-4.
52. Mullaney P, Wadley M, Hyde C, Wyatt J, Lawrence G, Hallissey M, et al. Appraisal of compliance with the UICC/AJCC staging system in the staging of gastric cancer. *Union Internacional Contra la Cancrum/American Joint Committee on Cancer. Br J Surg*. 2002 Nov;89(11):1405-8.
53. Coburn N. Lymph nodes and gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2009 Mar;99(4):199-206.

54. An J, Baik Y, Choi M, Noh J, Sohn T, Kim S. Predictive factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: analysis of a single institutional experience. *Ann Surg*. 2007 Nov;246(5):749-53.
55. Folli S, Morgagni P, Roviello F, De Manzoni G, Marrelli D, Saragoni L, 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*. 2001 Oct;31(10):495-9.
56. Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, et al. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer*. 2000 Dec;3(4):219-25.
57. Uña E. Gastric cancer: predictors of recurrence when lymph-node dissection is inadequate. *World J Surg Oncol*. 2009;7:69.
58. de Gara C, Hanson J, Hamilton S. A population-based study of tumor-node relationship, resection margins, and surgeon volume on gastric cancer survival. *Am J Surg*. 2003 Jul;186(1):23-7.
59. Ono H. Early gastric cancer: diagnosis, pathology, treatment techniques and treatment outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Aug;18(8):863-6.
60. Yasuda K. Early gastric cancer: diagnosis, treatment techniques and outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Aug;18(8):839-45.
61. Hyung WJ, Cheong JH, Kim J, Chen J, Choi SH, Noh SH. Application of minimally invasive treatment for early gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2004 Mar 15;85(4):181-5; discussion 6.
62. Hanaoka N, Tanabe S, Mikami T, Okayasu I, Saigenji K. Mixed-histologic-type submucosal invasive gastric cancer as a risk factor for lymph node metastasis: feasibility of endoscopic submucosal dissection. *Endoscopy*. 2009 May;41(5):427-32.
63. Maehara Y, Orita H, Okuyama T, Moriguchi S, Tsujitani S, Korenaga D, et al. Predictors of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg*. 1992 Mar;79(3):245-7.
64. Kwee R, Kwee T. Predicting lymph node status in early gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2008;11(3):134-48.
65. Morita H, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Nishimura C, et al. Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch*. 2009 Feb;454(2):143-51.
66. Tezuka K, Onoda N, Takashima T, Takagaki K, Ishikawa T, Wakasa T, et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion diagnosed by lymphatic endothelium immunostaining in breast cancer patients. *Oncol Rep*. 2007 May;17(5):997-1003.

67. Ishikawa Y, Aida S, Tamai S, Akasaka Y, Kiguchi H, Akishima-Fukasawa Y, et al. Significance of lymphatic invasion and proliferation on regional lymph node metastasis in renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007 Aug;128(2):198-207.
68. Ishii M, Ota M, Saito S, Kinugasa Y, Akamoto S, Ito I. Lymphatic vessel invasion detected by monoclonal antibody D2-40 as a predictor of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Sep;24(9):1069-74.
69. Roma A, Magi-Galluzzi C, Kral M, Jin T, Klein E, Zhou M. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Mar;19(3):392-8.
70. Pantel K, Brakenhoff R. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):448-56.
71. Li H, Lu P, Lu Y, Liu C, Xu H, Wang S, et al. Predictive factors for lymph node metastasis in poorly differentiated early gastric cancer and their impact on the surgical strategy. *World J Gastroenterol*. 2008 Jul;14(26):4222-6.
72. Park J, Kim S, Nam K, Cho Y, Lee I, Choi M, et al. Is it reasonable to treat early gastric cancer with signet ring cell histology by endoscopic resection? Analysis of factors related to lymph-node metastasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Oct;21(10):1132-5.
73. Talamonti MS, Kim SP, Yao KA, Wayne JD, Feinglass J, Bennett CL, et al. Surgical outcomes of patients with gastric carcinoma: the importance of primary tumor location and microvessel invasion. *Surgery*. 2003 Oct;134(4):720-7; discussion 7-9.
74. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, 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 Jan;59(1):77-82.
75. Sako A, Kitayama J, Ishikawa M, Yamashita H, Nagawa H. Impact of immunohistochemically identified lymphatic invasion on nodal metastasis in early gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2006;9(4):295-302.
76. Arnaout-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2007 Feb;20(2):183-91.
77. Lee C, Wu C, Lo S, Chen J, Li A, Hsieh M, et al. Survival predictors in patients with node-negative gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jul;22(7):1014-8.
78. Ichikawa D, Kubota T, Kikuchi S, Fujiwara H, Konishi H, Tsujiura M, et al. Prognostic impact of lymphatic invasion in patients with node-negative gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2009 May 27.

79. Nasu J, Nishina T, Hirasaki S, Moriwaki T, Hyodo I, Kurita A, et al. Predictive factors of lymph node metastasis in patients with undifferentiated early gastric cancers. *J Clin Gastroenterol*. 2006 May-Jun;40(5):412-5.
80. Song S, Park S, Kim S, Son H, Rhee J. Characteristics of intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastatic disease. *Histopathology*. 2004 May;44(5):437-44.
81. Son H, Song S, Kim S, Noh J, Sohn T, Kim D, et al. Characteristics of submucosal gastric carcinoma with lymph node metastatic disease. *Histopathology*. 2005 Feb;46(2):158-65.
82. Gotoda T, Sasako M, Ono H, Katai H, Sano T, Shimoda T. Evaluation of the necessity for gastrectomy with lymph node dissection for patients with submucosal invasive gastric cancer. *Br J Surg*. 2001 Mar;88(3):444-9.
83. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003 Sep 29;22(42):6549-56.
84. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*. 2006;57:1-18.
85. Weidner N. New paradigm for vessel intravasation by tumor cells. *Am J Pathol*. 2002 Jun;160(6):1937-9.
86. Weidner N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol*. 2000 Apr;31(4):403-5.
87. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*. 1997 Jul;22(7):251-6.
88. Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*. 2003 Jun;9(6):1144-55.
89. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):401-10.
90. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*. 2007 Jan;21(1):44-52.
91. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):3967-79.
92. Neufeld G, Kessler O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):373-85.
93. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*. 2006 Aug;5(16):1779-87.

94. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, et al. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Mar 1;98(5):316-25.
95. Weidner N. The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow. *Am J Clin Pathol.* 2004 Nov;122(5):675-7.
96. Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuni T, Kimura S, et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer.* 2005 Jun 20;115(3):388-92.
97. Fujishiro M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul;14(27):4289-95.
98. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer.* 2006 Jun 5;94(11):1643-9.
99. Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anat Sci Int.* 2006 Jun;81(2):71-83.
100. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Dec;25(4):677-94.
101. Ji RC, Kato S. Lymphatic network and lymphangiogenesis in the gastric wall. *J Histochem Cytochem.* 2003 Mar;51(3):331-8.
102. Coşkun U, Akyürek N, Dursun A, Yamaç D. Peritumoral Lymphatic Microvessel Density Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Gastric Carcinoma. *J Surg Res.* 2009 May.
103. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer.* 2006 Dec 18;95(12):1611-25.
104. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002 Aug;38(12):1564-79.
105. Kadota K, Huang CL, Liu D, Ueno M, Kushida Y, Haba R, et al. The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer.* 2008 May;44(7):1057-67.
106. Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2006 Oct;19(10):1317-23.

107. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology*. 2005 Sep;25(3):201-6.
108. Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci*. 2007 Winter;37(1):39-48.
109. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.
110. Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, Zhang QY, Chen H, Lin M, et al. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. *World J Gastroenterol*. 2003 Dec;9(12):2866-9.
111. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int*. 2006 Dec;56(12):717-23.
112. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J*. 2003 Jun;17(9):984-92.
113. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene*. 2003 Sep 29;22(42):6557-63.
114. Ding S, Li C, Lin S, Yang Y, Liu D, Han Y, et al. Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions. *Hum Pathol*. 2006 Jul;37(7):861-6.
115. Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2007;10(1):12-7.
116. Elpek G, Gelen T, Aksoy N, Karpuzoglu T, Keles N. Microvessel count, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 indices in gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2000;6(1):59-64.
117. Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R. 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):129-34.
118. Marks A, Sutherland D, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 1999 May;80(3-4):569-78.

119. Kahn H, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest.* 2002 Sep;82(9):1255-7.
120. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Arima H, Mataka Y, Ehi K, et al. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer.* 2005 Sep 19;93(6):688-93.
121. Mohammed R, Martin S, Gill M, Green A, Paish E, Ellis I. 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.* 2007 Dec;31(12):1825-33.
122. Zhao HC, Qin R, Chen XX, Sheng X, Wu JF, Wang DB, et al. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006 Dec 21;12(47):7598-603.
123. Yonemura Y, Endou Y, Tabachi K, Kawamura T, Yun HY, Kameya T, et al. Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40. *Hum Pathol.* 2006 Sep;37(9):1193-9.
124. Gao P, Zhou GY, Zhang QH, Xiang L, Zhang SL, Li C, et al. Clinicopathological significance of peritumoral lymphatic vessel density in gastric carcinoma. *Cancer Lett.* 2008 May 18;263(2):223-30.
125. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159-74.
126. Maehara Y, Oshiro T, Baba H, Ohno S, Kohnoe S, Sugimachi K. Lymphatic invasion and potential for tumor growth and metastasis in patients with gastric cancer. *Surgery.* 1995 Apr;117(4):380-5.
127. Setälä L, Kosma V, Marin S, Lipponen P, Eskelinen M, Syrjänen K, et al. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *Br J Cancer.* 1996 Sep;74(5):766-72.
128. Kamata I, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Uzuki M, et al. Significance of lymphatic invasion and cancer invasion-related proteins on lymph node metastasis in gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Mar 10.
129. Kim J, Park S, Park S, Kim S, Mok Y, Kim C, et al. Clinical Significance of Immunohistochemically-Identified Lymphatic and/or Blood Vessel Tumor Invasion in Gastric Cancer. *J Surg Res.* 2009 Aug.
130. Zheng HC, Li XH, Hara T, Masuda S, Yang XH, Guan YF, et al. Mixed-type gastric carcinomas exhibit more aggressive features and indicate the histogenesis of carcinomas. *Virchows Arch.* 2008 May;452(5):525-34.
131. Mohammed RA, Ellis IO, Elsheikh S, Paish EC, Martin SG. Lymphatic and angiogenic characteristics in breast cancer: morphometric analysis and prognostic implications. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jan;113(2):261-73.

132. Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, et al. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2007 Nov;9(9):793-800.
133. Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer.* 1999 Jun 1;85(11):2340-6.

## APÊNDICE A – Classificação TNM dos carcinomas do estômago.

FONTE: 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.).

### TNM classification of gastric tumours

TNM classification <sup>1</sup>		Stage Grouping		
<b>T – Primary Tumour</b>		<b>M – Distant Metastasis</b>		
TX	Primary tumour cannot be assessed	MX	Distant metastasis cannot be assessed	
T0	No evidence of primary tumour	M0	No distant metastasis	
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial tumour without invasion of the lamina propria	M1	Distant metastasis	
T1	Tumour invades lamina propria or submucosa	Stage 0	Tis	N0 M0
T2	Tumour invades muscularis propria or subserosa <sup>2</sup>	Stage IA	T1	N0 M0
T3	Tumour penetrates serosa (visceral peritoneum) without invasion of adjacent structures <sup>2,3,4,5</sup>	Stage IB	T1	N1 M0
T4	Tumour invades adjacent structures <sup>2,3,4,5</sup>		T2	N0 M0
<b>N – Regional Lymph Nodes</b>		Stage II	T1	N2 M0
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		T2	N1 M0
N0	No regional lymph node metastasis		T3	N0 M0
N1	Metastasis in 1 to 6 regional lymph nodes	Stage IIIA	T2	N2 M0
N2	Metastasis in 7 to 15 regional lymph nodes		T3	N1 M0
N3	Metastasis in more than 15 regional lymph nodes		T4	N0 M0
		Stage IIIB	T3	N2 M0
		Stage IV	T4	N1, N2, N3 M0
			T1, T2, T3	N3 M0
			Any T	Any N M1

<sup>1</sup>{1, 66}. This classification applies only to carcinomas.

<sup>2</sup> A help desk for specific questions about the TNM classification is available at <http://tnm.uicc.org>.

<sup>3</sup> A tumour may penetrate muscularis propria with extension into the gastrocolic or gastrohepatic ligaments or the greater and lesser omentum without perforation of the visceral peritoneum covering these structures. In this case, the tumour is classified as T2. If there is perforation of the visceral peritoneum covering the gastric ligaments or omenta, the tumour is classified as T3.

<sup>4</sup> The adjacent structures of the stomach are the spleen, transverse colon, liver, diaphragm, pancreas, abdominal wall, adrenal gland, kidney, small intestine, and retroperitoneum.

<sup>5</sup> Intramural extension to the duodenum or oesophagus is classified by the depth of greatest invasion in any of these sites including stomach.

**APÊNDICE B** – Protocolo de análises de peças cirúrgicas de carcinoma gástrico utilizado no Laboratório de Patologia Gástrica APM

FONTE: LEMES, L. A. O. *et al.* Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [S.l.], v. 39, n. 1, p. 9, 2003.

Carcinomas do estômago	nº do exame _____		
Procedimento cirúrgico	<input type="checkbox"/> gastrectomia total	<input type="checkbox"/> antrectomia	
	<input type="checkbox"/> gastrectomia subtotal	<input type="checkbox"/> coto gástrico	
	<input type="checkbox"/> quase total	<input type="checkbox"/> com _____	(outro órgão)
<b>Exame macroscópico</b>			
<b>Peça cirúrgica</b>			
Dimensões: pequena curvatura	_____ cm;	grande curvatura	_____ cm;
Duodeno:	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente _____ cm;	<input type="checkbox"/> não comprometido	<input type="checkbox"/> comprometido _____ cm
Esôfago:	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente _____ cm;	<input type="checkbox"/> não comprometido	<input type="checkbox"/> comprometido _____ cm
Jejuno:	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente _____ cm;	<input type="checkbox"/> não comprometido	<input type="checkbox"/> comprometido _____ cm
Epíplon:	<input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente _____ cm;	<input type="checkbox"/> não comprometido	<input type="checkbox"/> comprometido _____ cm
<b>Tumor</b>			
Dimensões:	_____ x _____ x _____ cm	(LxTxP)	
Localização:	<input type="checkbox"/> 1/3 distal <input type="checkbox"/> 1/3 médio <input type="checkbox"/> 1/3 proximal	<input type="checkbox"/> peq. curvatura	<input type="checkbox"/> gr. curvatura
	<input type="checkbox"/> parede anterior <input type="checkbox"/> parede posterior	<input type="checkbox"/> circunferencial	
<b>Aspecto macroscópico (classificação):</b>			
Tipo	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV de Borrmann		
	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> IIA <input type="checkbox"/> IIB <input type="checkbox"/> IIC <input type="checkbox"/> III (SJED- p/ neoplasia precoce)		
<b>Infiltração da parede gástrica até a:</b>			
	<input type="checkbox"/> mucosa <input type="checkbox"/> submucosa <input type="checkbox"/> muscular própria <input type="checkbox"/> subserosa <input type="checkbox"/> serosa		
Margens de ressecção:	Proximal <input type="checkbox"/> livre (_____ cm) <input type="checkbox"/> envolvida		
	Distal <input type="checkbox"/> livre (_____ cm) <input type="checkbox"/> envolvida		
Mucosa gástrica: adjacente à lesão	_____;		
restante	_____.		
Outros tecidos/órgãos:	_____.		
	_____.		
<b>Exame microscópico</b>			
<b>Classificação histológica da neoplasia</b>			
OMS	<input type="checkbox"/> adenocarcinoma SOE	<input type="checkbox"/> adenocarcinoma papilar	<input type="checkbox"/> adenocarcinoma tubular
	<input type="checkbox"/> carcinoma mucinoso (colóide: > 50% do tumor)	<input type="checkbox"/> ca células anel de sinete	
	<input type="checkbox"/> ca adenoescamoso	<input type="checkbox"/> ca células escamosas	<input type="checkbox"/> ca indiferenciado <input type="checkbox"/> ca pequenas células
Laurén tipo	<input type="checkbox"/> intestinal <input type="checkbox"/> difuso	<input type="checkbox"/> não classificável (misto)	<input type="checkbox"/> não classificável
Ming tipo	<input type="checkbox"/> infiltrativo	<input type="checkbox"/> expansivo	
Invasão vascular:	sangüínea <input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> não avaliável		
	linfática <input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> não avaliável		
Invasão perineural:	<input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> não avaliável		

**APÊNDICE B** – Protocolo de análises de peças cirúrgicas de carcinoma gástrico  
utilizado no Laboratório de Patologia Gástrica APM

FONTE: LEMES, L. A. O. *et al.* Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [S.l.], v. 39, n. 1, p. 9, 2003.

Invasão da parede gástrica (pT): ( ) tumor restrito à mucosa – pT1a  
 ( ) invasão até a submucosa – pT1b  
 ( ) invasão até a muscular própria – pT2a  
 ( ) invasão até a subserosa – pT2b  
 ( ) penetração da serosa (peritônio visceral) – pT3  
 ( ) invasão direta de .....  
 (órgãos/estruturas adjacentes) – pT4

Invasão do duodeno ( ) não ( ) sim \_\_\_\_\_ cm; esôfago ( ) não ( ) sim \_\_\_\_\_ cm  
 Margens de ressecção: proximal \_\_\_\_\_ cm; distal \_\_\_\_\_ cm

**Linfonodos:**  
 pequena curvatura: \_\_\_\_\_ dissecados; \_\_\_\_\_ com metástases  
 grande curvatura: \_\_\_\_\_ dissecados; \_\_\_\_\_ com metástases  
 em correspondência c/ \_\_\_\_\_ (tronco vascular): \_\_\_\_\_ dissecados; \_\_\_\_\_ com metástases

**Estadiamento (UICC- pN):** ( ) pNx (não avaliável)  
 ( ) pN0 – não se observam metástases em ..... linfonodos regionais  
 ( ) pN1 – metástases em ..... linfonodos perigástricos (1- 6)  
 ( ) pN2 – metástases em ..... linfonodos perigástricos (7-15 ou mais)  
 ( ) pN3 – metástases em ..... linfonodos perigástricos (> 15)

**Estômago não neoplásico:**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Estadiamento patológico (UICC):** ( ) pT ( ) pN ( ) pM ( ) estágio

**Outros tecidos/órgãos:** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Conclusão:**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**ANEXO A – Aprovação do trabalho pelo COEP – UFMG.**

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

**Parecer nº. ETIC 574/07**

**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 03 de agosto de 2009, o relatório final do projeto de pesquisa intitulado "**Angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico: correlação de marcadores imuno-histoquímicos com dados anatomo-patológicos dos pacientes**".

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

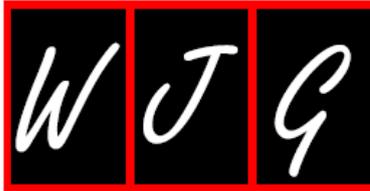
**ANEXO B** – Artigo publicado no World Journal of Gastroenterology

TÍTULO: Assessment of vascular invasion in gastric cancer: a comparative study

DATA DA PUBLICAÇÃO: 28 de junho de 2013

AUTORES: Letícia Trivellato Gresta, Ismael Alves Rodrigues Júnior, Lúcia Porto Fonseca de Castro, Geovanni Dantas Cassali, Mônica Maria Demas Álvares Cabral

PÁGINAS: 9 pag.



## Assessment of vascular invasion in gastric cancer: A comparative study

Letícia Trivellato Gresta, Ismael Alves Rodrigues-Júnior, Lúcia Porto Fonseca de Castro, Geovanni Dantas Cassali, Mônica Maria Demas Álvares Cabral

Letícia Trivellato Gresta, Ismael Alves Rodrigues-Júnior, Lúcia Porto Fonseca de Castro, Mônica Maria Demas Álvares Cabral, Department of Anatomic Pathology and Medicine, University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Brazil

Geovanni Dantas Cassali, Institute of Biological Sciences, University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

Author contributions: Gresta LT conceived of the study, and participated in its design, acquisition of data, execution and drafted the manuscript; Rodrigues-Júnior IA performed the statistical analysis and interpretation of data, critical review and helped to edit the manuscript; de Castro LPF carried out the immunoassays and participated in the critical review of the results and discussion; Cassali GD provided for some reagents and revised the manuscript critically; Cabral MMDA conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript; all authors read and approved the final manuscript.

Supported by Grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Correspondence to: Letícia Trivellato Gresta, MD, MSc, PhD, Department of Anatomic Pathology and Medicine, University Federal of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, Belo Horizonte 30130-100, Brazil. [ltrivellato@gmail.com](mailto:ltrivellato@gmail.com)

Telephone: +55-31-84548064 Fax: +55-31-38261792

Received: January 30, 2013 Revised: April 3, 2013

Accepted: April 13, 2013

Published online: June 28, 2013

### Abstract

**AIM:** To evaluate and compare detection of lymphatic and blood vessel invasion (LVI and BVI) by hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemistry (IHC) in gastric cancer specimens, and to correlate with lymph node status.

**METHODS:** IHC using D2-40 (a lymphatic endothelial marker) and CD34 (a pan-endothelial marker) was performed to study LVI and BVI in surgical specimens from

a consecutive series of 95 primary gastric cancer cases. The results of the IHC study were compared with the detection by HE using McNemar test and kappa index. The morphologic features of the tumors and the presence of LVI and BVI were related to the presence of lymph node metastasis. A  $\chi^2$  test was performed to obtain associations between LVI and BVI and other prognostic factors for gastric cancer.

**RESULTS:** The detection rate of LVI was considerably higher than that of BVI. The IHC study identified eight false-positive cases and 13 false-negative cases for LVI, and 24 false-positive cases and 10 false-negative cases for BVI. The average Kappa value determined was moderate for LVI ( $\kappa = 0.50$ ) and low for BVI ( $\kappa = 0.20$ ). Both LVI and BVI were statistically associated with the presence of lymph node metastasis (HE:  $P = 0.001$ ,  $P = 0.013$ , and IHC:  $P = 0.001$ ,  $P = 0.019$ ). The morphologic features associated with LVI were location of the tumor in the distal third of the stomach ( $P = 0.039$ ), Borrmann's macroscopic type ( $P = 0.001$ ), organ invasion ( $P = 0.03$ ) and the depth of tumor invasion ( $P = 0.001$ ). The presence of BVI was related only to the depth of tumor invasion ( $P = 0.003$ ).

**CONCLUSION:** The immunohistochemical identification of lymphatic and blood vessels is useful for increasing the accuracy of the diagnosis of vessel invasion and for predicting lymph node metastasis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key words:** Gastric cancer; Tumour-node-metastasis staging; Lymph node metastasis; Predictive factor; Lymphatic vessel invasion; Blood vessel invasion; Immunohistochemistry; CD34; D2-40

**Core tip:** The presence of lymphatic vessel invasion in gastric cancer is the strongest risk factor for lymph node metastasis and is known as an independent prog-

nostic factor. The subjective evaluation of vessel invasion performed with conventional hematoxylin-eosin staining can lead to inaccurate false-positive and false-negative results. This study shows that the immunohistochemical identification of lymphatic and blood vessels is useful for increasing the accuracy of the diagnosis of lymphatic and blood vessel invasion and for predicting lymph node metastasis in gastric cancer.

Gresta LT, Rodrigues-Junior IA, de Castro LPF, Cassali GD, Cabral MMDA. Assessment of vascular invasion in gastric cancer: A comparative study. *World J Gastroenterol* 2013; 19(24): 3761-3769 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i24/3761.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i24.3761>

## INTRODUCTION

Gastric cancer (GC) is the fourth most common cancer and the second most common cause of cancer deaths in the world<sup>[1]</sup>. A steady decline in the incidence and mortality rates of gastric carcinoma has been observed worldwide over the past several decades, but there is a significant variation in incidence between the populations at the greatest and least risk<sup>[2]</sup>. In areas without endoscopic screening for GC, especially in developing countries, GC presents as an advanced disease and has a high frequency of nodal involvement<sup>[3]</sup>. Surgery is the only effective intervention for a cure or for long-term survival and nodal status is one of the most important independent predictors of patient survival<sup>[4]</sup>.

The depth of invasion is an independent prognostic factor for gastric carcinoma and is associated with patient survival<sup>[5,6]</sup>. Early GC is limited to the mucosa and submucosa and is associated with a better prognosis. In Japan, where asymptomatic patients are screened, there is a high incidence of early diagnosis, ranging from 30% to 50%, in contrast with the smaller fraction of 16%-24% in Western countries<sup>[2]</sup>. Minimizing the number of invasive procedures used in cancer treatment is critical for improving the patient's quality of life. Minimally invasive treatments, such as endoscopic mucosal resection, may be possible only in highly selective cases of early GC<sup>[7-9]</sup>.

Lymph node metastasis is one of the most important prognostic factors in patients with GC<sup>[2,10]</sup>. Studies have estimated that the lymph nodes will be involved in 3%-5% of cases of gastric adenocarcinoma limited to the mucosa, in 11%-25% of cases limited to the submucosa, in 50% of T2 tumors and in 83% of T3 tumors<sup>[11]</sup>. Hence the accurate assessment of potential lymph node metastasis is an important issue for the appropriate treatment of early GC.

The histologic identification of lymphatic vessel invasion (LVI) by tumor cells has long been recognized as a potential prognostic indicator and a predictor of patient outcomes in various malignancies<sup>[12-16]</sup>. One of the earliest steps in the metastatic cascade is (lympho)vascular invasion,

*i.e.*, the penetration of tumor cells into lymph and/or blood vessels in and around the primary tumor<sup>[19-21]</sup>. Therefore, tumor cell emboli in the lymph and blood vessels are considered to be the morphological correlates of metastases to loco-regional lymph nodes and to distant hematogenous sites, respectively. Consistent with the distribution of lymphatic vessels in the gastric wall, LVI is most frequently observed in the muscularis mucosa layer and in the superficial submucosa<sup>[22,23]</sup>.

Usually, LVI and blood vessel invasion (BVI) are identified based on conventional hematoxylin-eosin (HE) staining, and the diagnosis is made based on the presence of tumor emboli within the vascular channels lined by a single layer of endothelial cells, with or without red blood cells<sup>[14,19,20]</sup>. However, if the cancer cells completely obliterate the lumen, it is not possible to diagnose vascular invasion. Additionally, retraction artifacts that isolate tumor aggregates *via* tissue shrinkage during fixation are sometimes confused with true tumor emboli in lymphatic vessels. Besides, using that criterion, vascular invasion detected on HE sections does not always allow for a distinction between BVI and LVI<sup>[14]</sup>.

Recently, interest in vascular invasion has increased because of the development of specific markers for the lymphatic endothelium used in immunohistochemistry (IHC), such as Prox-1, which is a transcription factor; Lyve-1, which is a hyaluronan receptor; podoplanin, which is a glomerular podocyte membrane protein and D2-40<sup>[21]</sup>. It has been demonstrated that D2-40 is the best marker for the lymphatic endothelium<sup>[24]</sup>. Used in combination with panendothelial markers such as CD34 or CD31, D2-40 permits the differentiation between BVI and LVI and the study of both processes in GC metastasis<sup>[25]</sup>.

There have been numerous studies regarding LVI and BVI in GC. However, most of them have not defined the criteria used to determine the presence or absence of lymphatic and vascular invasion. Additionally, many large retrospective series of GC cases have extracted the reporting of (lympho)vascular invasion from the patients' medical records, without histological reviews by central pathologists for consistency and without immunohistochemical studies<sup>[6,9,15,26]</sup>. Uncertain criteria for the diagnosis of (lympho)vascular invasion may affect the clinical assessment of prognosis and may change the course of therapy for the patients<sup>[27-30]</sup>.

The aim of this study was to evaluate, in a consecutive series of patients with GC, a technique that uses a combined immunohistochemical expression profile to detect LVI and BVI and compare this technique to routine HE assessment. In addition, we analyzed the relationship between lymph node metastasis and clinicopathological findings, especially those of LVI and BVI re-evaluated by IHC staining.

## MATERIALS AND METHODS

This study was reviewed and approved by the university's research ethics committee (COEP-UFGM). Ninety-five consecutive cases of GC, diagnosed and treated between

**Table 1 Clinicopathological characteristics of 95 patients with gastric cancer *n* (%)**

Clinicopathological data	
Sex	
Male	62 (65.3)
Female	33 (34.7)
Curvature	
Small curvature	54 (56.8)
Large curvature	10 (10.5)
Small and large	14 (14.7)
Not evaluated	17 (17.9)
Primary tumor	
pT1a	9 (9.5)
pT1b	12 (12.6)
pT2a	12 (12.6)
pT2b	8 (8.4)
pT3	51 (53.7)
pT4	3 (3.2)
Regional lymph nodes	
pN0	28 (29.5)
pN1	36 (37.9)
pN2	13 (13.7)
pN3	12 (12.6)
pNx	6 (6.3)
Distant metastasis	
pMx	87 (91.6)
pM1	8 (8.4)
Lauren classification	
Intestinal	45 (47.4)
Diffuse	25 (26.3)
Mixed/indeterminate	25 (26.3)
WHO classification	
Adenocarcinoma NOS	48 (50.5)
Tubular	5 (5.3)
Papillary	5 (5.3)
Mucinous	4 (4.2)
Signet-ring cell	22 (23.2)
Undifferentiated	9 (9.5)
Others	2 (2.2)
Ming classification	
Expansive	40 (42.1)
Infiltrative	40 (42.1)
Not evaluated	15 (15.8)

NOS: Not otherwise specified; WHO: World Health Organization; pT: Primary tumor; pN: Regional lymph nodes; pM: Distant metastasis.

2000 and 2006 and identified from the pathology archives, were selected for study. All patients underwent curative gastrectomy with standard lymphadenectomy at the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais. None of the patients had received preoperative radiation therapy or chemotherapy. In total, 57 patients underwent distal gastrectomy, 33 had total gastrectomy and five had partial gastrectomy.

All surgical specimens of the primary tumors and regional lymph nodes had been processed and examined histologically by routine HE staining, according to the institutional protocol<sup>[31]</sup>. The definitions of stages and the criteria for histological classification followed the World Health Organization classification<sup>[2]</sup> and the Japanese classification for GC<sup>[32]</sup>. The resected primary tumors and regional lymph nodes were reviewed histologically by two pathologists using HE staining.

IHC for CD34 and D2-40 was then performed on

the corresponding paraffin blocks. Serial 4- $\mu$ m-thick sections were deparaffinized in xylene and rehydrated. A hydrogen peroxide quench, using 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with methyl alcohol, was performed for 20 min. A 15-min incubation with a serum-free protein blocking agent was then performed. Antigen retrieval was performed using EDTA buffer at pH 9.0 (CD34), a citrate buffer at pH 6.0 (D2-40) and a steam cooker for 20 min, with a bench cool down period of 15 min. A 30-min incubation in the primary antibodies (Biogenex CD34 monoclonal mouse antihuman, clone QBEND/10, at 1:10 dilution; Dako D2-40 monoclonal mouse antihuman, clone D2-40, at 1:30 dilution) was performed at room temperature. Secondary detection consisted of a 30-min incubation using Labeled Streptavidin-Biotin link (Dako LSAB<sup>®</sup>+ System), and the staining was visualized by a 5-min incubation with diaminobenzidine tetrahydrochloride. The slides were counterstained with Harris' hematoxylin and cover-slipped. A normal stomach was used for the control slide for each immunohistochemical stain. For the negative control, all of the reagents except for the primary antibody were used.

All slides were assessed simultaneously by two investigators (Gresta LT and Cabral MMDA) on a double-observation microscope, without knowledge of the clinicopathological data. The slides (HE, CD34 and D2-40) were screened for (lympho)vascular invasion using strict criteria<sup>[14]</sup>. With HE, invasion was considered only if the tumor cells were within an endothelium-lined, vessel-like structure. With IHC, vessels with endothelial cells stained by CD34, but not by D2-40, were recognized as blood vessels, and vessels with endothelial cells stained by both CD34 and D2-40 were recognized as lymphatic vessels. Every vessel with tumor cell invasion on one of the three consecutive sections was identified in the other slides and was classified as a blood vessel or lymphatic invasion, based on the immunohistochemical staining profile.

### Statistical analysis

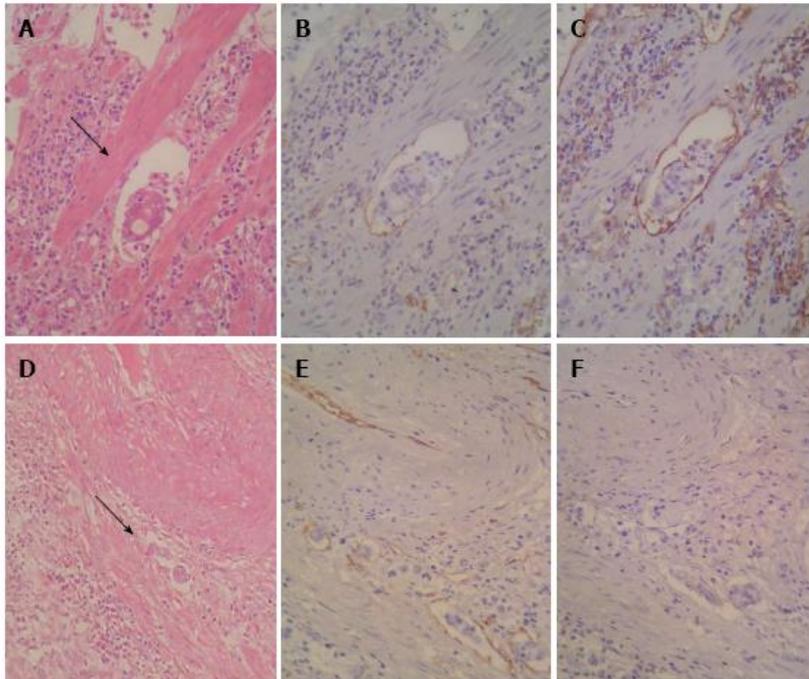
The statistical calculations were performed using SPSS 17.0 statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL, United States). The McNemar test was used to determine the significance of intergroup differences.  $P \leq 0.05$  was considered to be statistically significant. The estimation of the agreement rate between the two methods was obtained using the Kappa statistic ( $\kappa$ ). A  $\chi^2$  test was applied for the analysis of associations between categorical variables.

## RESULTS

The clinical and pathological characteristics of the 95 patients with GC are summarized in Table 1. Lymphatic vessels were identified by immunostaining as D2-40-positive and CD34-positive (Figure 1A-C). Blood vessels were identified by immunostaining as D2-40-negative and CD34-positive (Figure 1D-F).

### Lymphatic and BVI (HE and IHC)

Histological HE staining revealed LVI from the primary



**Figure 1** Sequential sections stained with hematoxylin and eosin and Immunohistochemistry showing neoplastic cell emboli within a space surrounded by the endothelial lining (arrows). A: Lymphatic vessel invasion (LVI)-hematoxylin and eosin (HE, × 400); B: LVI CD34 (× 400); C: LVI D2-40 (× 400); D: Blood vessel invasion (BVI) (HE, × 100); E: BVI CD34 (× 200); F: BVI D2-40 (× 200).

**Table 2** Diagnostic agreement between methods of detection for lymphatic and blood vessel invasion (*n* = 95)

Variables		HE	IHC	<i>P</i> value	$\kappa$
LVI	Positive	61	66	0.38	0.50
	Negative	34	29		
BVI	Positive	38	26	0.02	0.20
	Negative	57	69		

BVI: Blood vessel invasion; LVI: Lymphatic vessel invasion; HE: Hematoxylin and eosin; IHC: Immunohistochemistry.

tumor in 61 of the 95 patients (64.2%). In 53 of those cases, LVI detected by HE staining was confirmed with D2-40 staining. In contrast, LVI was newly detected in 13 of 34 patients who had been diagnosed as free of LVI by HE staining. Figure 2 shows examples of false-positive and false-negative for LVI.

The specimens examined using HE staining showed a false-negative BVI rate of 12.6% (12/95) and a false-positive rate of 25.2% (24/95). The positive rate of BVI determined by HE staining was 40% (38/95); however, BVI was confirmed by CD34 in only 27.4% of the cases (26/95).

Figure 3 shows the prevalence of LVI and BVI with conventional HE staining and IHC in 95 primary tumors. Table 2 shows the average kappa values for both methods determined separately for LVI and BVI. The agreement was fair for BVI ( $\kappa$  = 0.20) and medium for LVI ( $\kappa$  = 0.50).

**Table 3** Correlation between lymphatic and blood vessel invasion and lymph node status (*n* = 89) *n* (%)

Vascular invasion		Lymph node metastasis		<i>P</i> value
		Negative	Positive	
LVI-HE	Negative	23 (71.8)	9 (28.2)	0.001
	Positive	5 (8.8)	52 (91.2)	
LVI-IHC	Negative	20 (74.0)	7 (26.0)	0.001
	Positive	8 (13.0)	54 (87.0)	
BVI-HE	Negative	22 (41.5)	31 (58.5)	0.013
	Positive	6 (16.6)	30 (83.4)	
BVI-IHC	Negative	25 (38.5)	40 (61.5)	0.019
	Positive	3 (12.5)	21 (87.5)	

IHC: Immunohistochemistry; HE: Hematoxylin and eosin; BVI: Blood vessel invasion; LVI: Lymphatic vessel invasion.

**Correlation of LVI and BVI with other prognostic factors**  
The LVI and BVI diagnosed by both HE and IHC were significantly correlated with lymph node metastasis, as shown in Table 3.

Table 4 shows other clinical-pathologic variables that were significantly correlated with LVI and BVI when detected by IHC.

**DISCUSSION**

To improve the detection of vascular invasion in GC, which is normally performed by routine HE staining, and to distinguish LVI from BVI, we introduced an IHC method using the combination of two markers: one spe-

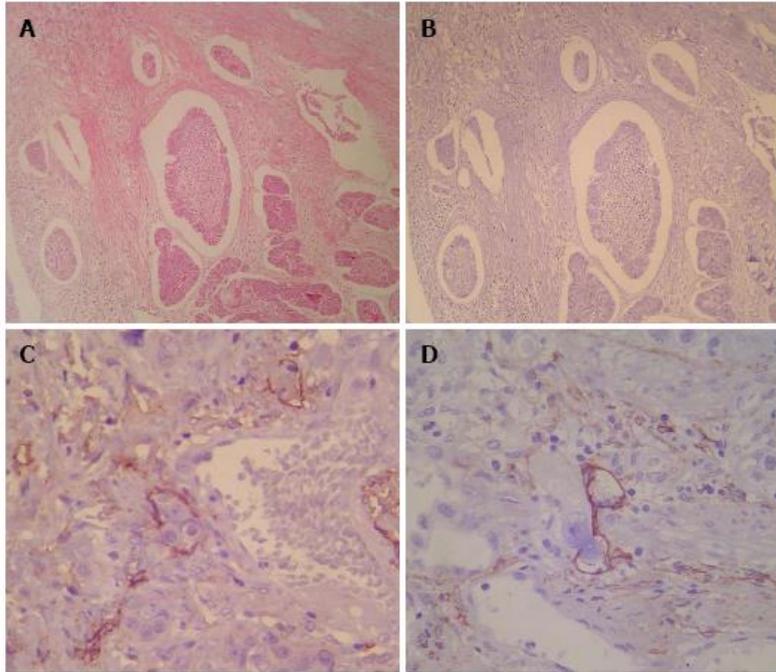
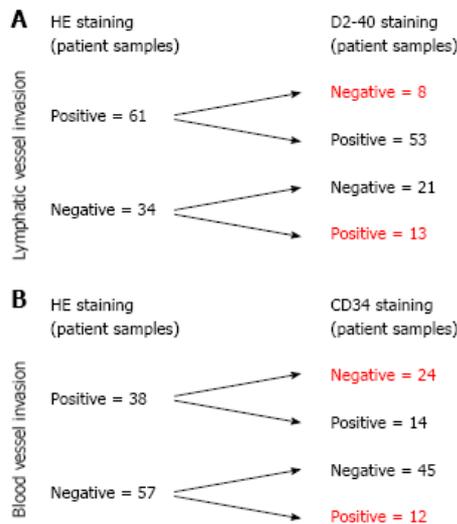


Figure 2 Example of a patient diagnosed for lymphatic vessel invasion by routine histological examination. A: Example of a patient diagnosed as positive for lymphatic vessel invasion (LVI) by routine histological examination; B: As false-positive for lymphatic vessel invasion by D2-40 ( $\times 100$ ); C, D: Examples of patients diagnosed as free of LVI by routine histological examination. False-negatives for LVI detected by D2-40 ( $\times 400$ ).

**Table 4 Correlation of lymphatic and blood vessel invasion detected by immunohistochemistry with other prognostic factors ( $n = 95$ )**  
*n* (%)

Data	LVI			BVI		
	Negative	Positive	<i>P</i> value	Negative	Positive	<i>P</i> value
Tumor location						
Distal third	15 (27.3)	40 (72.7)	0.0391	42 (76.3)	13 (23.7)	0.281
Other locations	14 (35.0)	26 (65.0)		29 (72.5)	11 (27.5)	
Curvature						
Small curvature	19 (35.2)	35 (64.8)	0.122	41 (76.0)	13 (24.0)	0.131
Large curvature	3 (30.0)	7 (70.0)		8 (80.0)	2 (20.0)	
Small and large	1 (7.2)	13 (92.8)		7 (50.0)	7 (50.0)	
Macroscopy						
Borrmann I	5 (71.4)	2 (28.6)	0.0011	7 (100.0)	0 (0.0)	0.24
Borrmann II	4 (13.3)	26 (86.7)		21 (70.0)	9 (30.0)	
Borrmann III	5 (18.5)	22 (81.5)		17 (62.9)	10 (37.1)	
Borrmann IV	0 (0.0)	12 (100.0)		7 (58.3)	5 (41.7)	
Organ invasion						
Negative	26 (45.6)	31 (54.4)	0.0051	46 (80.7)	11 (19.3)	0.297
Duodenum	1 (4.3)	22 (95.7)		15 (65.2)	8 (34.8)	
Esophagus	1 (12.5)	7 (87.5)		6 (75.0)	2 (25.0)	
Both E + D	0 (0.0)	3 (100.0)		1 (33.3)	2 (66.7)	
Other	1 (25.0)	3 (75.0)		3 (75.0)	1 (25.0)	
Tumor depth						
Early	17 (80.9)	4 (19.1)	0.0011	21 (100.0)	0 (0.0)	0.0031
Advanced	12 (16.2)	62 (83.8)		50 (67.5)	24 (32.5)	
Laurén histology						
Intestinal	12 (26.6)	33 (73.3)	0.228	36 (80.0)	9 (20.0)	0.332
Diffuse	11 (44.0)	14 (56.0)		19 (76.0)	6 (24.0)	
Mixed/not classified	6 (24.0)	19 (76.0)		16 (64.0)	9 (36.0)	

BVI: Blood vessel invasion; LVI: Lymphatic vessel invasion; E + D: Esophagus + duodenum.



**Figure 3** Diagnostic comparison in 95 patients with gastric cancer. A: Diagnostic comparison of lymphatic vessel invasion; B: Diagnostic comparison of blood vessel invasion. HE: Hematoxylin and eosin.

sific to the lymphatic vessel endothelium (D2-40) and the other pan-endothelial (CD34). In addition to the effective detection of LVI and BVI, this method also enabled the correct evaluation of the predictive value of vascular invasion in GC for the occurrence of lymph node metastasis. As we expected, the identification of LVI and BVI was also correlated with other prognostic factors important for GC, such as tumor depth and organ invasion, which have been detected in other studies.

In this study, the group of 95 patients generally reflected the profile of GC described in the literature with regard to age, gender, location of tumor and Laurén histological type. The patients with diffuse-type carcinoma were significantly younger than those with the intestinal-type ( $P = 0.04$ ). This peculiar feature of diffuse-type neoplasms is well established and reflects differences in pathogenesis that are generally linked to genetic factors, whereas intestinal-type neoplasms are more influenced by environmental factors, such as diet and infection with *Helicobacter pylori*.

Data from the literature indicate that most diagnoses in developing countries occur late, when the disease is already in the advanced stage<sup>[31]</sup>. In our study, 53.7% of the GCs were in-depth stage pT3 tumors. Additionally, more than half of our sample (64.2%) had lymph node metastasis at the time of diagnosis.

The prevalence of LVI and BVI in GC has been determined in various studies to vary from 7.2% to 86%<sup>[9,15,20,33-35]</sup>. This wide variation in results could be explained by the different methods used to evaluate vascular invasion, *i.e.*, HE only or usage of IHC staining with endothelium-specific markers. Three consistent instances of this variation include the studies of Arigami *et al.*<sup>[36]</sup>, of Sako *et al.*<sup>[22]</sup> and of Yonemura *et al.*<sup>[23]</sup>, who reported higher rates of detection of LVI with the IHC method when compared

to routine staining with HE. All three studies strengthened the role of IHC in the analysis of vascular invasion in GC<sup>[36]</sup>.

We observed that the difference between HE and IHC when detecting LVI was not statistically significant ( $P = 0.38$ ). However, there were 8 cases of false-positive and 13 cases of false-negative that were isolated only after IHC. Thus, the Kappa coefficient was considered to be only moderate for LVI ( $\kappa = 0.50$ ). The evaluation of LVI by only HE is subject to these misconceptions because of the inability to distinguish retraction artifacts around glands or cell groups from true vascular invasion. Occasionally, neoplastic cells occupy the vascular lumen completely, which makes their identification impossible without specific marking of the lymphatic endothelium. Additionally, false-positive results can occur when BVI is misinterpreted as LVI with HE staining only<sup>[36]</sup>.

The correlation between LVI and the presence of metastasis was statistically significant when assessed by both methods ( $P = 0.001$ ). This finding agrees with published data, in which LVI of the primary tumor was found to be crucial for the occurrence of lymph node metastasis<sup>[37]</sup>. Therefore, it is possible to infer that LVI is more widely found in patients with lymph node metastases than in those in which the examined lymph nodes are negative.

We found 24 cases of false-positives for BVI with HE and 10 false-negatives identified by IHC. Therefore, the detection of BVI was more accurate and significantly less frequent with IHC than with HE ( $P = 0.02$ ). This result produced a very low Kappa coefficient ( $\kappa = 0.20$ ) because of the identification of a large number of cases as false-positives. The false-positive results obtained could be explained as cases of LVI that were inadvertently interpreted as BVI, as it is not possible to distinguish between blood vessels and lymphatic vessels in all cases using only HE<sup>[14]</sup>.

Our results show that BVI evaluated by both methods is positively correlated with the presence of lymph node metastasis, in contrast to what has been demonstrated by some previous studies<sup>[7]</sup>. It is interesting to note that although the previous studies have examined large numbers of cases, they performed retrospective review studies that included only cases of early GC, which explains the low occurrence of lymph node metastasis and BVI. Our study, in contrast, analyzed BVI and lymph node metastasis not only in early GC but also in advanced cases of GC, which resulted in the statistical significance described in Table 4.

The presence of lymph node metastasis is considered to be the most important prognostic factor in GC, and it is related to the presence of vascular invasion<sup>[37,38]</sup>. Retrospective studies have shown that the presence of LVI and BVI detected by the IHC method is related to tumor recurrence in patients with and without lymph node metastasis and is also related to a low survival rate<sup>[16,36,39]</sup>. In this regard, our study revealed the importance of LVI and BVI as predictive factors, even in the absence of lymph node involvement.

The early GC concept applies to those tumors with more superficial infiltration of the gastric wall. It is thought that cases of early GC are less likely to show invasion of blood and lymph vessels. Our data show that, compared with advanced GC, early GC exhibits less lymph node involvement ( $P = 0.001$ ), less LVI ( $P = 0.001$ ) and less BVI ( $P = 0.007$ ) detected by IHC. However, studies of lymphatic network density in the normal gastric wall have found that the concentration of lymphatic vessels is considerably greater in the muscularis mucosa, which can be infiltrated in early GC<sup>[22]</sup>.

The risk of lymph node metastasis in early GC is only 3.2% for the intramucosal and is approximately 19.2% when invasion reaches the submucosa<sup>[40]</sup>. Our results agree with these findings. We found two cases of early GC (11.2%) with invasion of the submucosa and lymph node metastasis. Conversely, in 59 cases of advanced GC (83.0%), the lymph nodes were positive for metastasis.

At present, non invasive imaging methods to properly evaluate the likelihood of lymph node metastasis in GC do not exist. Thus, lymph node staging in early GC still relies on the assessment of specific tumor characteristics that are related to increased lymph node metastasis, *i.e.*, depth of tumor infiltration in the gastric wall, tumor size greater than 2.0 cm, Laurén histological classification and LVI. It is noteworthy that, among these factors, the presence of lymphatic vessel involvement is the most significant isolated predictive factor for the occurrence of lymph node metastasis<sup>[7]</sup>. Thus, it is essential to include LVI and BVI evaluation by IHC in routine pathologic protocols of GC surgical specimens.

Gastrectomy with lymphadenectomy is indicated in poorly differentiated intramucosal carcinomas, with dimensions larger than 20 mm or in submucosal carcinomas. However, these criteria are quite strict and may result in unnecessary surgery. Gotoda *et al.*<sup>[41]</sup> proposed more expanded criteria for the endoscopic treatment of early GC that combined histological type, LVI and BVI, ulceration and tumor size, thereby enabling the expansion of the universe of patients with early GC who could potentially be eligible for endoscopic resection, even with submucosal invasion.

The meta-analysis published by Kwee *et al.*<sup>[40]</sup> revealed several variables significantly associated with the presence of lymph node metastasis in early GC. Most of these predictive factors may be perfectly evaluated through pre-operative exams, endoscopy with biopsy and non-invasive imaging methods, such as computed tomography and endoscopic ultrasound. However, the presence or absence of LVI and BVI can only be judged by a histopathological study after tumor resection.

LVI and BVI must be systematically analyzed as the histological parameters with the greatest prognostic significance and as decisive factors in the choice of complementary adjuvant therapy. Therefore, we suggest that more sensitive and more specific methods be incorporated into the routine protocols for histopathological examination of GC.

Our results show that the application of IHC using

two combined markers (CD34 and D2-40) provides a more accurate detection of LVI and BVI when compared to routine staining with HE. These findings may be of great value in clinical practice, especially in cases in which it is not possible to determine the precise lymph node status because of an insufficient number of lymph nodes or because lymphadenectomy was not performed.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to pay tribute to professor Ana Margarida MF Nogueira in recognition of her great contribution to our work and to gastrointestinal pathology.

## COMMENTS

### Background

Gastric cancer (GC) is the fourth most common cancer and the second most common cause of cancer deaths in the world. Lymph node metastasis is one of the most important prognostic factors in patients with GC. The presence of lymphatic vessel invasion in GC is the strongest risk factor for lymph node metastasis and is known as an independent prognostic factor.

### Research frontiers

Usually, lymphatic and blood vessel invasion (BVI) are identified based on conventional hematoxylin-eosin staining, and the diagnosis is made based on the presence of tumor emboli within the vascular channels lined by a single layer of endothelial cells, with or without red blood cells. However, this subjective evaluation can lead to inaccurate false-positive and false-negative results.

### Innovations and breakthroughs

Recently, interest in vascular invasion has increased because of the development of specific markers for the lymphatic endothelium used in immunohistochemistry (IHC), such as Prox-1, which is a transcription factor; Lyve-1, which is a hyaluronan receptor; podoplanin, which is a glomerular podocyte membrane protein and D2-40. It has been demonstrated that D2-40 is the best marker for the lymphatic endothelium. Used in combination with panendothelial markers such as CD34 or CD31, D2-40 permits the differentiation between lymphatic and BVI and the study of both processes in GC metastasis.

### Applications

Uncertain criteria for the diagnosis of (lympho)vascular invasion may affect the clinical assessment of prognosis and may change the course of therapy for the patients. This study shows that the immunohistochemical identification of lymphatic and blood vessels is useful for increasing the accuracy of the diagnosis of lymphatic and BVI and for predicting lymph node metastasis in GC.

### Terminology

Blood and lymphatic vessels show different functions and phenotypic expression. IHC is a procedure which identifies specific antigens expressed by the cells or tissues, making it possible to determine their origin. Vascular invasion is the presence of tumor cells within the lumen of blood or lymphatic vascular spaces, which can be transported into the bloodstream, producing metastasis.

### Peer review

Authors demonstrated that the IHC of two different endothelial markers D2-40 and CD34 is useful for accurate diagnosis of vessel invasion and for predicting lymph node metastasis.

## REFERENCES

- 1 Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 472: 467-477 [PMID: 19107449 DOI: 10.1007/978-1-60327-492-0\_23]
- 2 Aaltonen LA, Hanulton SR, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon. Oxford: IARC Press/Oxford University Press distributor, 2000
- 3 Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors.

- Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 633-649 [PMID: 16997150]
- 4 Coburn NG. Lymph nodes and gastric cancer. *J Surg Oncol* 2009; 99: 199-206 [PMID: 19142901 DOI: 10.1002/jso.21224]
  - 5 Zheng HC, Li XH, Hara T, Masuda S, Yang XH, Guan YF, Takano Y. Mixed-type gastric carcinomas exhibit more aggressive features and indicate the histogenesis of carcinomas. *Virchows Arch* 2008; 452: 525-534 [PMID: 18266006 DOI: 10.1007/s00428-007-0572-7]
  - 6 Talamonti MS, Kim SP, Yao KA, Wayne JD, Feinglass J, Bennett CL, Rao S. Surgical outcomes of patients with gastric carcinoma: the importance of primary tumor location and microvessel invasion. *Surgery* 2003; 134: 720-777; discussion 727-729 [PMID: 14605635 DOI: 10.1016/S0039-6060(03)00337-4]
  - 7 An JY, Baik YH, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Kim S. Predictive factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: analysis of a single institutional experience. *Ann Surg* 2007; 246: 749-753 [PMID: 17968165 DOI: 10.1097/SLA.0b013e31811f3fb7]
  - 8 Hanaoka N, Tanabe S, Mikami T, Okayasu I, Saigenji K. Mixed-histologic-type submucosal invasive gastric cancer as a risk factor for lymph node metastasis: feasibility of endoscopic submucosal dissection. *Endoscopy* 2009; 41: 427-432 [PMID: 19418397 DOI: 10.1055/s-0029-1214495]
  - 9 Hyung WJ, Cheong JH, Kim J, Chen J, Choi SH, Noh SH. Application of minimally invasive treatment for early gastric cancer. *J Surg Oncol* 2004; 85: 181-185; discussion 186 [PMID: 14991872 DOI: 10.1002/jso.20018]
  - 10 Greene FL, American Joint Committee on Cancer, American Cancer Society. AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002
  - 11 de Gara CJ, Hanson J, Hamilton S. A population-based study of tumor-node relationship, resection margins, and surgeon volume on gastric cancer survival. *Am J Surg* 2003; 186: 23-27 [PMID: 12842743 DOI: 10.1016/S0002-9610(03)00116-8]
  - 12 Arnaout-Alkaraïn A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol* 2007; 20: 183-191 [PMID: 17206106 DOI: 10.1038/modpathol.3800728]
  - 13 Niakosari F, Kahn HJ, Marks A, From L. Detection of lymphatic invasion in primary melanoma with monoclonal antibody D2-40: a new selective immunohistochemical marker of lymphatic endothelium. *Arch Dermatol* 2005; 141: 440-444 [PMID: 15837861 DOI: 10.1001/archderm.141.4.440]
  - 14 Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, Vermeulen PB, Van Marck EA. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer* 2006; 94: 1643-1649 [PMID: 16670715 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603152]
  - 15 Nasu J, Nishina T, Hirasaki S, Moriwaki T, Hyodo I, Kurita A, Nishimura R. Predictive factors of lymph node metastasis in patients with undifferentiated early gastric cancers. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 412-415 [PMID: 16721222 DOI: 10.1097/00004836-200605000-00009]
  - 16 Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozum K, Nakahara M, Nakao K, Kakudo K. 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 [PMID: 16394285 DOI: 10.1136/jcp.2005.028779]
  - 17 Ishii M, Ota M, Saito S, Kinugasa Y, Akamoto S, Ito I. Lymphatic vessel invasion detected by monoclonal antibody D2-40 as a predictor of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 1069-1074 [PMID: 19387662 DOI: 10.1007/s00384-009-0699-x]
  - 18 Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y, Shakhtour B, Revetta F, Washington MK. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 1816-1821 [PMID: 18779725 DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181816083]
  - 19 Weidner N. New paradigm for vessel intravasation by tumor cells. *Am J Pathol* 2002; 160: 1937-1939 [PMID: 12057896 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61141-8]
  - 20 Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1729-1738 [PMID: 16597644 DOI: 10.1093/carcin/bgl031]
  - 21 Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 367-397 [PMID: 18039141 DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151515]
  - 22 Sako A, Kitayama J, Ishikawa M, Yamashita H, Nagawa H. Impact of immunohistochemically identified lymphatic invasion on nodal metastasis in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 295-302 [PMID: 17235632 DOI: 10.1007/s10120-006-0396-1]
  - 23 Yonemura Y, Endou Y, Tabachi K, Kawamura T, Yun HY, Kameya T, Hayashi I, Bandou E, Sasaki T, Miura M. Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40. *Hum Pathol* 2006; 37: 1193-1199 [PMID: 16938525 DOI: 10.1016/j.humpath.2006.04.014]
  - 24 Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002; 82: 1255-1257 [PMID: 12218087]
  - 25 Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 677-694 [PMID: 17160713 DOI: 10.1007/s10555-006-9026-y]
  - 26 Liu C, Zhang R, Lu Y, Li H, Lu P, Yao F, Jin F, Xu H, Wang S, Chen J. Prognostic role of lymphatic vessel invasion in early gastric cancer: a retrospective study of 188 cases. *Surg Oncol* 2010; 19: 4-10 [PMID: 19042124 DOI: 10.1016/j.suronc.2008.10.003]
  - 27 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 1-18 [PMID: 16409133 DOI: 10.1146/annurev.med.57.121304.131306]
  - 28 Morita H, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Nishimura C, Igarashi Y, Miki K, Ishii T. Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch* 2009; 454: 143-151 [PMID: 19104832 DOI: 10.1007/s00428-008-0717-3]
  - 29 Fujishiro M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4289-4295 [PMID: 18666315 DOI: 10.3748/wjg.14.4289]
  - 30 Ichikawa D, Kubota T, Kikuchi S, Fujiwara H, Konishi H, Tsujiura M, Ikoma H, Nakanishi M, Okamoto K, Sakakura C, Ochiai T, Kokuba Y, Otsuji E. Prognostic impact of lymphatic invasion in patients with node-negative gastric cancer. *J Surg Oncol* 2009; 100: 111-114 [PMID: 19475584 DOI: 10.1002/jso.21311]
  - 31 Lemes L, Neunschwander L, Matta L, Osório Filho J, Soares P, Cabral M, Nogueira A, Rodrigues M. Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39: 9 [DOI: 10.1590/S1676-24442003000100012]
  - 32 Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition. *Gastric Cancer* 1998; 1: 10-24 [PMID: 11957040]
  - 33 Maehara Y, Oshiro T, Baba H, Ohno S, Kohno S, Sugimachi K. Lymphatic invasion and potential for tumor growth and metastasis in patients with gastric cancer. *Surgery* 1995; 117: 380-385 [PMID: 7716718]
  - 34 Setälä LP, Kosma VM, Marin S, Lipponen PK, Eskelinen MJ, Syrjänen KJ, Alhava EM. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *Br J Cancer* 1996; 74: 766-772 [PMID: 8795580]
  - 35 Kamata I, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Uzuki M, Fujimoto A, Morita H, Tamai S, Maehara

- T, Ogata K, Shimokawa R, Igarashi Y, Miki K, Ishii T. Significance of lymphatic invasion and cancer invasion-related proteins on lymph node metastasis in gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; **24**: 1527-1533 [PMID: 19383080 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.05810.x]
- 36 Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Arima H, Mataka Y, Ehi K, Yanagida S, Ishigami S, Hokita S, Aikou T. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; **93**: 688-693 [PMID: 16136051 DOI: 10.1038/sj.bjc.6602739]
- 37 Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 448-456 [PMID: 15170447 DOI: org/10.1038/nrc1370]
- 38 Yokota T, Ishiyama S, Saito T, Teshima S, Narushima Y, Murata K, Iwamoto K, Yashima R, Yamauchi H, Kikuchi S. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand J Gastroenterol* 2004; **39**: 380-384 [PMID: 15125471]
- 39 Kim JH, Park SS, Park SH, Kim SJ, Mok YJ, Kim CS, Lee JH, Kim YS. Clinical significance of immunohistochemically-identified lymphatic and/or blood vessel tumor invasion in gastric cancer. *J Surg Res* 2010; **162**: 177-183 [PMID: 20031164 DOI: 10.1016/j.jss.2009.07.015]
- 40 Kwee RM, Kwee TC. Predicting lymph node status in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2008; **11**: 134-148 [PMID: 18825308 DOI: 10.1007/s10120-008-0476-5]
- 41 Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; **3**: 219-225 [PMID: 11984739 DOI: 10.1007/PL00011720]

P- Reviewers Langley RR, Pan WS, Shen LZ, Shibata MA  
S- Editor Gou SX L- Editor A E- Editor Xiong L



**ANEXO C** – Artigo enviado e aceito para publicação no periódico *Journal of Cancer Science and Therapy*

TÍTULO: Microvessel density quantification in gastric cancer: comparing methods for standard measures

DATA DO ACEITE: 27 de setembro de 2014

AUTORES: Letícia Trivellato Gresta, Ismael Alves Rodrigues Júnior, Mônica Maria Demas Álvares Cabral

PÁGINAS: 6 pag.

*This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.*



ISSN:1948-5956

## **Journal of Cancer Science & Therapy**

---

The International Open Access  
Journal of Cancer Science & Therapy

**Special Issue Title: Gastrointestinal Cancer**

### **Handling Editors**

**Dr. Yu-Fei Jiao**

Hospital of Harbin Medical University, China

**Available online at:** OMICS Publishing Group ([www.omicsonline.org](http://www.omicsonline.org))

This article was originally published in a journal by OMICS Publishing Group, and the attached copy is provided by OMICS Publishing Group for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Digital Object Identifier: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.1000299>

---



Research Article

Open Access

## Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures

Leticia Trivellato Gresta\*, Ismael Alves Rodrigues Júnior and Mônica Maria Demas Álvares Cabral

Department of Anatomic Pathology and Medicine, University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Brazil

### Abstract

The quantification of angiogenic and lymphangiogenic factors has been explored in an attempt to predict the prognosis of various malignancies. In gastric cancer (GC), a promising parameter is the microvessel density (MVD).

**Objective:** The aim of our study is to evaluate the different methods used for its quantification.

**Methods:** 52 cases of GC were labeled by immunohistochemistry for CD34, CD105 and D2-40. The quantification of the microvasculature was performed for each marker by counting microvessels (mv) in three "hot spots", using three different microscopic magnifications (100x, 200x and 400x). MVD was then calculated by dividing the number of vessels by the microscopic field area (measured in mm<sup>2</sup>) and compared between the three different evaluations.

**Results:** the MVD obtained for CD34 was 203 mv/mm<sup>2</sup> (100x), 311 mv/mm<sup>2</sup> (200x) and 490 mv/mm<sup>2</sup> (400x). The MVD score for CD105 was 127 mv/mm<sup>2</sup> (100x), 213 mv/mm<sup>2</sup> (200x) and 347 mv/mm<sup>2</sup> (400x). The MVD obtained for D2-40 was 35 mv/mm<sup>2</sup> (100x), 69 mv/mm<sup>2</sup> (200x) and 170 mv/mm<sup>2</sup> (400x). We found that MVD obtained in 100x magnification was lower than 200x, which was lower than in 400x. Those differences were statistically significant and occurred in a proportional way for all three markers. MVD obtained for CD34 was higher than for CD105. The MVD for lymphatics obtained by D2-40 was lower than the MVD for CD34 and CD105.

**Conclusion:** Our results show that the lack of standardized methods for assessing angiogenesis and lymphangiogenesis in GC can produce variations in the MVD value, impairing the reproducibility of the results and the comparison between different studies and populations. It is necessary to standardize the MVD determination methods to compare results and confirm its prognostic value in GC and in other types of tumors.

**Keywords:** Gastric cancer; Angiogenesis; Lymphangiogenesis; Microvessel count; Microvessel density; Prognosis; Immunohistochemistry; CD34; CD105; D2-40

### Introduction

Current research on neoplastic diseases focus on revealing new indicators capable of predicting the biological behavior of tumors and the prognosis of patients in the early stages of the disease. The study of angiogenic and lymphangiogenic factors has been explored in an attempt to predict the prognosis of various types of cancers [1-5]. Angiogenesis and lymphangiogenesis can be assessed directly by counting vessels or indirectly by analysis of inducing factors [6-8].

In the first report on the correlation between tumor angiogenesis and metastasis, Weidner et al performed a quantitative study of blood vessels stained by immunohistochemistry (IHC) in areas of high vascular density in breast cancer [1]. From the pathological point of view, it is expected that the mechanisms responsible for the relationship between the tumor and local endothelial cells are particularly active in those highly vascularized areas, called *hot spots*. These areas presumably arise due to the existence of angiogenic tumor cell clone, which is more likely to enter the bloodstream and result in metastases [9]. Since then, subsequent studies have attempted to evaluate the association between tumor progression and angiogenic potential of different cancers [10,11]. A promising parameter in gastric cancer (GC) is the microvessel density (MVD), both lymphatic and blood vessel [12,13].

The method originally proposed by Weidner et al. in 1991 for determining MVD used the 200x microscopic magnification to perform the vessel count [1]. However, further studies involving MVD in other malignancies, including GC, used non-standard variations

of the original method, such as 400x magnification vessel count, producing inconsistent results and problematic in terms of comparison [3,14-16]. In those reports, there is a tendency to describe MVD as number of vessels per microscopic field evaluated, rather than number of vessels per area, for example square millimeter (mm<sup>2</sup>). There are significant variations in the field area between microscope producers and models. Thus, the data reported in the literature are mixed and therefore inconsistent to allow a proper conclusion about which values of MVD would be considered at risk for metastasis or predictive of a bad prognosis.

To evaluate the methods for the study of angiogenesis and lymphangiogenesis in GC and compare the results between three different microscopic magnifications, we performed a vessel count and MVD determination using IHC with CD34, CD105 and D2-40 markers in a series of 52 cases of GC, analyzing three different microscopic magnifications for blood and lymph vessels.

\*Corresponding author: Leticia Trivellato Gresta, MD, PhD, Department of Anatomic Pathology and Medicine, University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Brazil, Tel: +55-31-84548064; Fax: +55-31-38261792; E-mail: [letrivellato@gmail.com](mailto:letrivellato@gmail.com)

Received July 30, 2014; Accepted September 27, 2014; Published September 30, 2014

Citation: Gresta LT, Júnior IAR, Cabral MMDÁ (2014) Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures. J Cancer Sci Ther 6: 401-405. doi:10.4172/1948-5956.1000299

Copyright: © 2014 Gresta LT, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Gresta LT, Júnior IAR, Cabral MMDÁ (2014) Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures. J Cancer Sci Ther 6: 401-405. doi:10.4172/1948-5956.1000299

## Material and Methods

This is a cross-sectional study of a series of cases of primary GC with IHC study. We selected 52 cases of GC retrospectively from the database of the Gastrointestinal Pathology research laboratory from Hospital das Clínicas of Federal University of Minas Gerais. All patients underwent a gastrectomy and lymphadenectomy for GC in the same institution.

The IHC study was performed in tumor sections using streptavidin-biotin peroxidase (Dako LSAB<sup>+</sup> + System) with CD34, CD105 and D2-40 markers. All slides were pre-treated in a buffer at 98°C in a steamer for 20 minutes for antigen retrieval. Blockage of endogenous peroxidase and avidin protein for 15 minutes each were carried out. The D2-40, CD34 and CD105 primary antibodies were incubated for 30 minutes at room temperature. The slides were revealed with diaminobenzidine. The background staining was performed with hematoxylin. Positive and negative controls were included in all reactions.

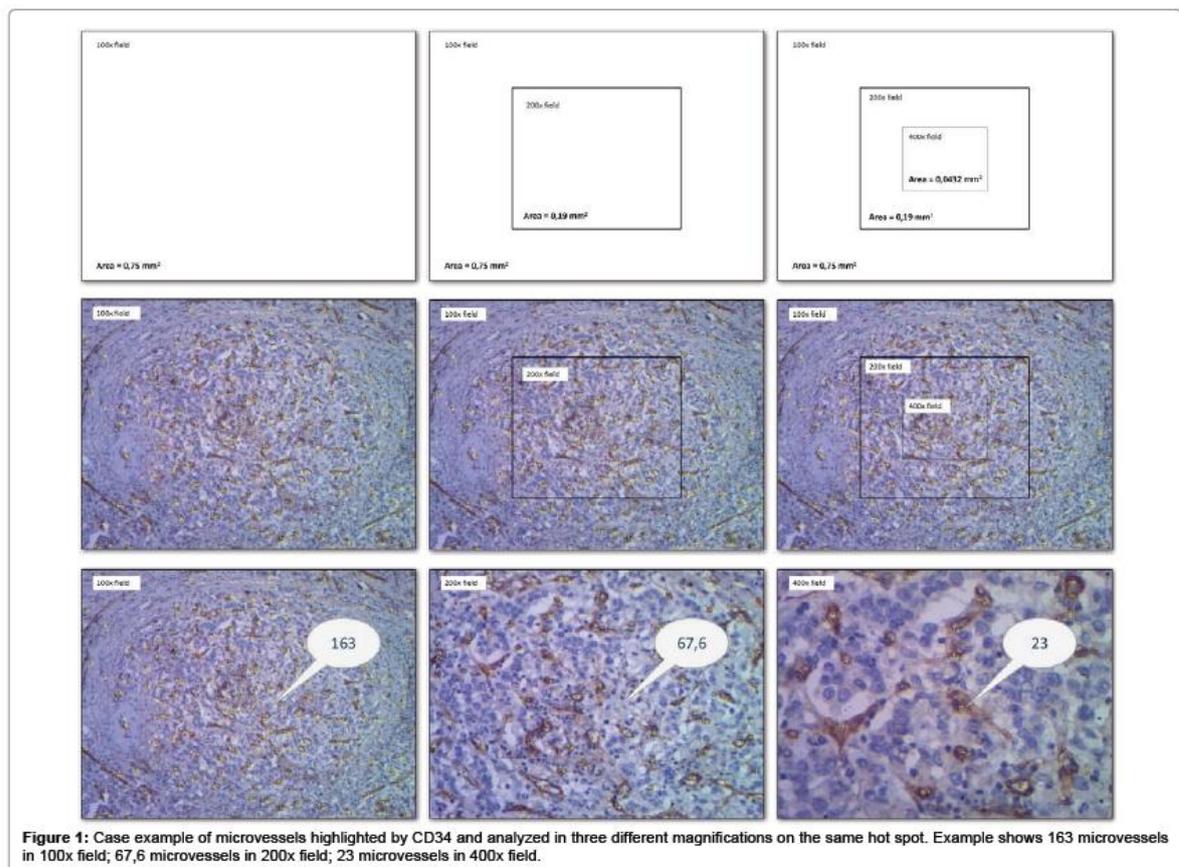
The quantification of the microvasculature was performed according to the method described by Weidner et al. [1]. The three *hot spots* were initially detected at lower magnification (40x) and selected in each marker. Those areas were captured and digitized for morphometric image analysis. The microvessel count was performed in the same hot spot area using the following microscopic magnifications: 100x, 200x

and 400x. Isolated endothelial cells or groups of cells highlighted by the endothelial markers, with or without lumen, were considered as individual vessels and counted manually using the software Image J (Figure 1). The mean values of microvessel count from the three *hot spots* in each magnification and each marker was calculated. The MVD was then determined dividing the number of vessels (mean microvessel count) by the microscopic field area of each magnification (in mm<sup>2</sup>) for each marker. The method used is illustrated in Figure 2.

## Results

The clinicopathologic characteristics of the sample are shown in Table 1. We observed the following distribution of cases according to Lauren's classification: 25 cases of intestinal type GC (48.1%), 12 of the diffuse type (23.1%) and 15 of mixed type (28.8%). Seven cases represented early CG (pT1) and 45 cases advanced CG, of which the majority (33 cases) shows tumor invasion up to the serosa (pT3). Lymph node metastasis was detected in 39 cases (75.0%).

The mean MVD obtained for CD34 was 203 microvessels/mm<sup>2</sup> (100x), 311 microvessels/mm<sup>2</sup> (200x) and 490 microvessels/mm<sup>2</sup> (400x). The mean MVD obtained for CD105 was 127 microvessels/mm<sup>2</sup> (100x), 213 microvessels/mm<sup>2</sup> (200x) and 347 microvessels/mm<sup>2</sup> (400x). The mean MVD obtained for D2-40 was 35 microvessels/mm<sup>2</sup> (100x), 69 microvessels/mm<sup>2</sup> (200x) and 170 microvessels/mm<sup>2</sup> (400x).



**Citation:** Gresta LT, Júnior IAR, Cabral MMDÁ (2014) Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures. *J Cancer Sci Ther* 6: 401-405. doi:10.4172/1948-5956.1000299

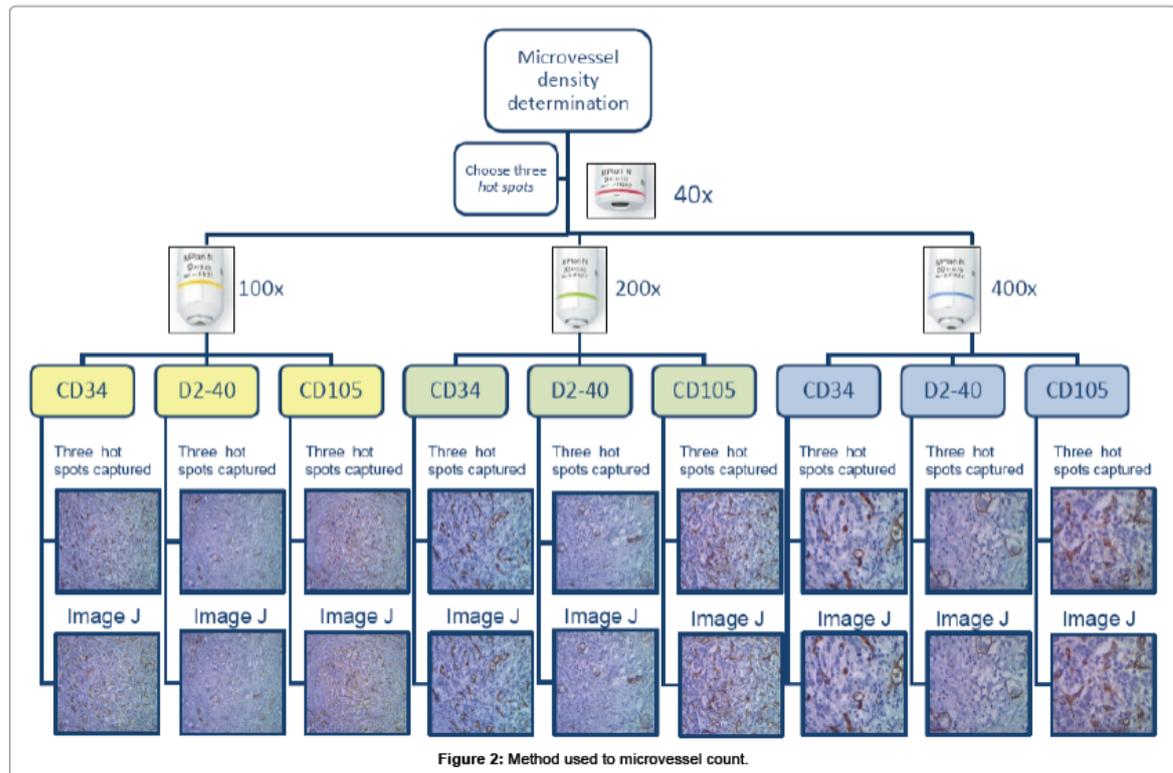


Figure 2: Method used to microvessel count.

The MVD obtained for CD34 was higher than the MVD by CD105. Lymphatic MVD obtained by D2-40 was considerably lower than the MVD by CD105 and CD34. We observed that the mean MVD for 100x magnification was lower than that for the 200 x magnification, which was lower than the mean MVD for 400x magnification. Those differences occurred in a proportional and similar way for the three IHC markers studied. To assess whether those differences were statistically significant, we performed the ANOVA test, confirming the significance of our observation (Table 2). Figure 3 shows the comparison of mean MVD of each microscopic magnification and each IHC marker used.

## Discussion

In this study, the group of 52 patients reflected the profile usually described in the literature for GC on the following characteristics: the majority of patients were male (65.4%), tumor topography was predominantly in the distal third of the stomach (55.8%) and the most frequent histological type according to Laurén corresponded to the intestinal type (48.1%) [17]. Cases of GC in advanced stages were the vast majority, and 67.3% were at least on stage pT3 tumor depth. Our sample is in agreement with the literature that indicates that the majority of diagnoses of GC in our country are made in a late stage, already as an advanced disease [17]. Note also that three fourth of cases (75.0%) had already lymph node metastasis at diagnosis.

If we try to compare the MVD values of blood and lymph vessels found in our study with the results of other studies available in the literature, we find a lack of standardization on the MVD determining

method. It is possible to observe microvessel count values expressed only by a microscopic field and not by  $\text{mm}^2$ . Some authors do not even register the precise definition of the microscopic field area used for counting. Previous series of GC using CD34 found MVD values much lower as compared to our study, but those values were expressed only by number of microvessels per field of 200x or 400x, but not by  $\text{mm}^2$  [11,14,18]. Only two other studies show similar values to our MVD results [13,19].

Regarding the lymph vessel MVD, the literature is still scarce and most authors demonstrate microvessel count only in the microscopic magnification of 200x. Perhaps this choice is justified by the fact that lymphatic vessels are larger and more distended than blood vessels, thus in need of a higher size field [20]. Our mean lymph vessels counted per 200x field was similar to the ones found in two other series of GC [13,21].

Analyzing the differences found on the mean MVD between IHC markers studied, the lymph vessel MVD was considerably lower than the blood vessel MVD by CD34 and CD105. The lymphatic system is known to be scarcer than the blood network on the gastric wall [20]. This difference was consistent with the results of two other studies regarding the MVD obtained by markers of the lymphatic and blood endothelium in CG [13,18].

The MVD evaluation using markers CD34 and CD105 showed distinct patterns of expression. As previously reported by Ding and colleagues in 2006, the microvessel count with CD105 is lower than the one assessed by CD34 [15]. It is expected that CD105 marker highlights

Citation: Gresta LT, Júnior IAR, Cabral MMDÁ (2014) Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures. J Cancer Sci Ther 6: 401-405. doi:10.4172/1948-5956.1000299

Clinico-pathologic parameters	N = 31 (%)
Gender	
Male	34 (65.4)
Female	18 (34.6)
Tumor topography	
Proximal third	8 (15.4)
Medium third	3 (5.8)
Distal third	29 (55.8)
Proximal+medium	1 (1.9)
Medium +distal	3 (5.8)
Proximal+medium+distal	7 (13.5)
Esophagogastric junction	1 (1.9)
Curvature	
Small curvature	27 (51.9)
Large curvature	4 (7.7)
Small and large	13 (25.0)
Not evaluated	8 (15.4)
Tumor depth (pT)	
Mucosa (pT1a)	2 (3.8)
Submucosa (pT1b)	5 (9.6)
Muscular propria (pT2a)	6 (11.5)
Subserosa (pT2b)	4 (7.7)
Serosa (pT3)	33 (63.5)
Structure invasion (pT4)	2 (3.8)
Lymph node metastasis	
Negative	13 (25.0)
Positive	39 (75.0)
Organ invasion	
Negative	27 (51.9)
Duodenum	13 (25.0)
Esophagus	6 (11.5)
Esophagus + duodenum	3 (5.8)
Other	3 (5.8)
Laurén classification	
Intestinal	25 (48.1)
Diffuse	12 (23.1)
Mixed	15 (28.8)

Table 1: Clinico-pathological characteristics of 52 cases of GC.

just newly formed blood vessels, while CD34 is a pan-endothelial marker [22,23].

Our most intriguing result was the uniform and almost proportional difference in the mean MVD between the three microscopic magnifications studied. This is perhaps the most interesting result of our work, since it is yet unpublished. We observed that the values of MVD for 100x, expressed as number of vessels per mm<sup>2</sup>, was consistently lower than MVD for 200x, which was lower than MVD for 400x. This variation could be identified not only in the mean values of MVD, but also for each individual case. Initially the study, we expected to obtain values of MVD similar or identical between the different microscopic magnifications, since the field captured vessel count was always the same. However, the difference in MVD values was statistically significant and occurred in all three IHC markers. This variation can be interpreted as reflecting the uneven distribution of blood and lymph vessels in the gastric wall and also in the tumor tissue. Even the most vascularized tumor areas, called *hot spots*, show a higher concentration of vessels in its central region. When examining the periphery of the *hot spot*, we notice a lower concentration of vessels in contrast to the central region. Maybe that is why we obtained higher densities using higher microscopic magnifications, as 400x. Also, those fields are more detailed and can increase the number of microvessels identified.

Once established the significant difference of results depending on the method chosen for microvessel count, it is necessary to carry on new prognostic studies to determine which microscopic magnification would be most adequate for MVD count in GC. However, the literature still lacks comparative studies using different microscopic magnifications and field areas to study angiogenesis and lymphangiogenesis in GC. Our study evaluated the MVD using three IHC markers for blood and lymph vessels endothelium, in three different microscopic magnifications, applying the same method described by Weidner [1]. In our opinion, studies using the *hot spot* method for vessel count should always express MVD values by microvessels/mm<sup>2</sup> and the magnification field area used should always be given.

## Conclusion

In summary, our results show that the lack of standardized methods

IHC Marker	Microscopic magnification	Mean MVD	Standart -deviation	P value
CD34	100x	203.06	66.14	< 0,001*
	200x	311.44	105.09	
	400x	490.01	166.05	
D2-40	100x	35.64	10.64	< 0,001*
	200x	69.59	20.34	
	400x	170.12	59.48	
CD105	100x	127.26	58.58	< 0,001*
	200x	213.97	95.36	
	400x	347.27	133.56	

\*difference statistically significant (ANOVA test)

Table 2: Analysis of variance between the mean MVD values found in each microscopic magnification. (N = 52).

Citation: Gresta LT, Júnior IAR, Cabral MMDÁ (2014) Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures. *J Cancer Sci Ther* 6: 401-405. doi:10.4172/1948-5956.1000299

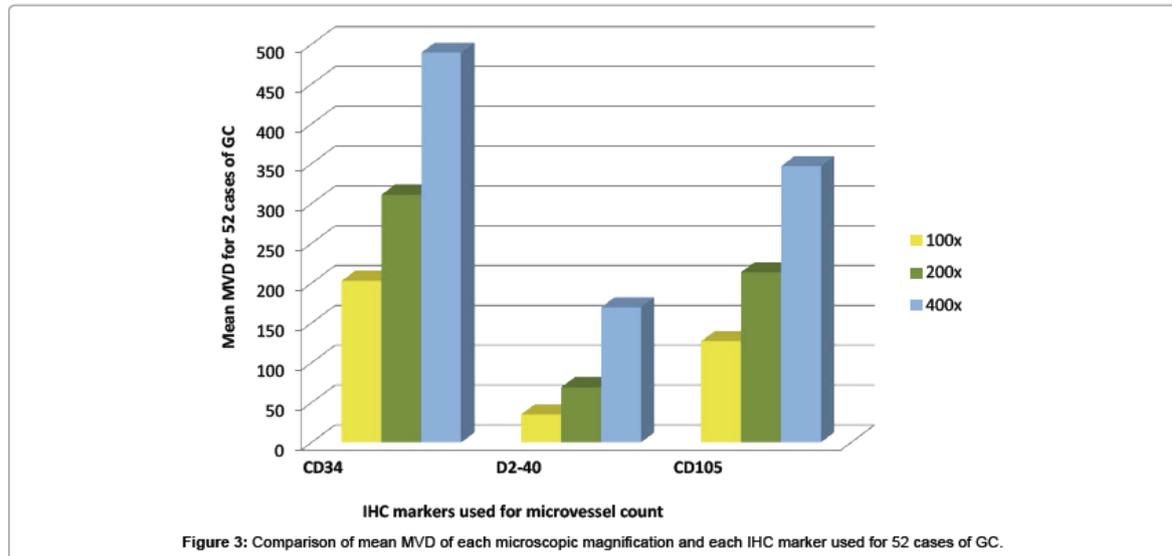


Figure 3: Comparison of mean MVD of each microscopic magnification and each IHC marker used for 52 cases of GC.

for assessing angiogenesis and lymphangiogenesis in GC can produce variations in the MVD value, impairing the reproducibility of the results and the comparison between different studies and populations. The standardization of MVD quantification is required to help confirm its prognostic value in CG and in other types of malignancies.

#### Acknowledgement

Financial support: The research has received the grants from CAPES. And the authors have no conflict of interest.

#### References

- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8.
- Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K (2005) Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology* 25: 201-206.
- Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, et al. (2006) Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol* 19: 1317-1323.
- Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, et al. (2007) Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci* 37: 39-48.
- Kadota K, Huang CL, Liu D, Ueno M, Kushida Y, et al. (2008) The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer* 44: 1057-1067.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, et al. (2002) Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 38: 1564-1579.
- Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, et al. (2006) First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 95: 1611-1625.
- Neufeld G, Kessler O (2006) Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 25: 373-385.
- Weidner N (2002) New paradigm for vessel intravasation by tumor cells. *Am J Pathol* 160: 1937-1939.
- Weidner N (2000) Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol* 31: 403-405.
- Zhao HC, Qin R, Chen XX, Sheng X, Wu JF, et al. (2006) Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12: 7598-7603.
- Talamonti MS, Kim SP, Yao KA, Wayne JD, Feinglass J, et al. (2003) Surgical outcomes of patients with gastric carcinoma: the importance of primary tumor location and microvessel invasion. *Surgery* 134: 720-727.
- CoÅYkun U, AkyÅYrek N, Dursun A, YamaÅŞ D (2010) Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma. *J Surg Res* 164: 110-115.
- Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, Karpuzoglu T, Keles N (2000) Microvessel count, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 indices in gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 6: 59-64.
- Ding S, Li C, Lin S, Yang Y, Liu D, et al. (2006) Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions. *Hum Pathol* 37: 861-866.
- Gao P, Zhou GY, Zhang QH, Xiang L, Zhang SL, et al. (2008) Clinicopathological significance of peritumoral lymphatic vessel density in gastric carcinoma. *Cancer Lett* 263: 223-230.
- Lemes LAO, Neunschwander LC, Matta LAC, Filho JO, Soares PCM, et al. (2003) Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 39: 57-65.
- Morita H, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, et al. (2009) Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch* 454: 143-151.
- Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R (2001) Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res* 7: 129-134.
- Ji RC, Kato S (2003) Lymphatic network and lymphangiogenesis in the gastric wall. *J Histochem Cytochem* 51: 331-338.
- Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, et al. (2006) 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* 59: 77-82.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984-992.
- Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, Zhang QY, Chen H, et al. (2003) Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. *World J Gastroenterol* 9: 2866-2869.

**ANEXO D** – Apresentação de pôster, com publicação de resumo em anais do evento e no periódico Gastroenterology

EVENTO: Digestive Disease Week 2012 (DDW 2012)

DATA: 22 de maio de 2012

LOCAL: San Diego, CA (EUA)

SOCIEDADE PROMOTORA: Associação Americana de Gastroenterologia (AGA)

TÍTULO: Comparative analysis of the immunohistochemistry method using D2-40 and CD34 against the routine staining for the detection of lymphatic and blood vessel invasion on gastric câncer: correlation with lymph node status

ANAIS DO EVENTO: Gastroenterology

09/10/12

DDW 2012 Certificate of Attendance



## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This verifies that

**LETICIA TRIVELLATO GRESTA, MD**

has attended Digestive Disease Week® 2012  
held at the San Diego Convention Center  
in San Diego, CA,  
Saturday, May 19 – Tuesday, May 22, 2012

A handwritten signature in cursive script that reads 'Lawrence S. Friedman, MD'. The signature is written in a dark ink and is positioned above the printed name and title.

**Lawrence S. Friedman, MD**  
Chair, DDW Council

**DDW LLC**  
4930 Del Ray Avenue  
Bethesda, MD 20814  
(301) 654-2055



 **DDW2012**  
Digestive Disease Week

**May 19-22, 2012**  
**Exhibit Dates: May 20-22, 2012**  
San Diego Convention Center  
San Diego, CA

Supported by a grant from



**ACCEPTED ABSTRACTS**

- Full Text Search
- Advanced Search
- DDW Program
- DDW.org
- DDW OnDemand
- Disclosure Index
- CONTACT DDW

Please visit [ddw.apprisor.org](http://ddw.apprisor.org) for the most current DDW 2012 agenda.

Mo1566

**Comparative Analysis of the Immunohistochemistry Method Using D2-40 and CD34 Against the Routine Staining for the Detection of Lymphatic and Blood Vessel Invasion on Gastric Cancer: Correlation With Lymph Node Status**

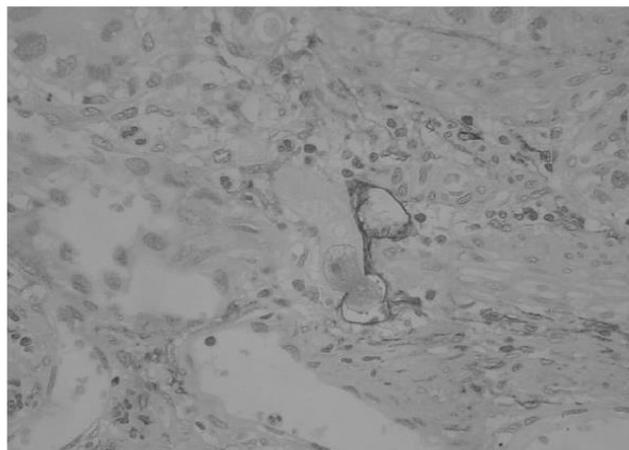
Leticia T. Gresta, Nayze L. Aldeman, Leonardo M. Fonseca, Luisa L. Castro, Renato S. Laboissière, Mônica Maria A. Cabral

Gastric cancer (GC) is worldwide the second leading cause of cancer-related death. The TNM staging system for GC is widely used and provides important prognostic information, especially with regards to the lymph node status. The detection of lymphatic vessel invasion (LVI) on the primary tumor is the strongest risk factor for lymph node metastasis. Lymph node metastasis is considered an independent prognostic factor for patients with GC. The evaluation of LVI with conventional Hematoxylin and Eosin (H&E) staining can generate inaccurate diagnosis, with considerable rates of false-positive and false-negative results. D2-40 is a specific monoclonal antibody for the lymphatic endothelium and is useful to identify LVI and distinguish lymphatic from true blood vessel invasion (BVI). The aims of this study are to compare the detection rates of LVI and BVI with H&E and immunohistochemistry in a series of GC specimens, and also evaluate their predictive value for the presence of lymph node metastasis. **METHODS:** Immunohistochemistry using D2-40 and CD34 was performed to study LVI and BVI in surgical specimens of a consecutive series of 95 primary GC. These results were compared to those obtained from the study of LVI and BVI by H&E. Both results were related to the presence of lymph node metastasis. **RESULTS:** From the 61 cases with LVI detected by H&E, eight were identified as false-positive by IHC. This method also detected 13 new cases of LVI, that were considered negative by H&E. BVI was identified in 38 cases (40.0%) by H&E. Immunohistochemistry confirmed only 24 (25.2%) of those cases. The comparison of LVI detected by both methods was not statistically significant. There was significant difference between these methods regarding BVI (p=0,02). The average Kappa value determined for LVI was moderate (Kappa=0,50) and low for BVI (Kappa=0,20). The correlation between lymph node metastasis and the presence of LVI and BVI was statistically significant when evaluated by H&E (p=0,001, p=0,013), and immunohistochemistry (p=0,001, p=0,019). **CONCLUSION:** LVI was more easily identified in the D2-40 immunostained sections than in the H&E stained sections. The presence of LVI and BVI is associated with the presence of lymph node metastasis. These are morphological features of poor prognosis, probably reflecting the tumor potential for metastatic spread and aggressive behavior. Our results show that the IHC method with these two markers is superior to the conventional H&E staining for detecting LVI and BVI in GC specimens. The immunohistochemical identification of lymphatic and blood vessels is useful to increase the diagnostic accuracy of vessel invasion and to predict lymph node metastasis in GC.

Diagnostic agreement between methods of detection of LVI and BVI (N=95).

		H&E	D2-40 and CD34	p VALUE	KAPPA
LVI	POSITIVE	61	66	0.38	0.50
	NEGATIVE	34	29		
BVI	POSITIVE	38	26	0.02*	0.20
	NEGATIVE	57	69		

\* statistically significant



Lymphatic vessel invasion: D2-40 highlights the lymphatic endothelium (x400).



Gastroenterology - Search x

www.gastrojournal.org/search/results

AGAJournals.org | mobile | RSS Feeds | Login | Register

Articles & Issues | Collections | Multimedia | International Editions | CME | For Authors | Journal Info | Resource Centers | AGA

Search for  in All Fields  [Advanced Search](#)

### Search Results

You searched for "Gresta" within Author within Gastroenterology, Vol 142, Issue 5

[Edit Search](#) | [Save Search](#) | [Save Search as an E-mail Alert](#)

**Periodicals (1)**

1

View Abstracts | Email Abstracts | Add to My Reading List | Export Citations | Number of entries per page: 20 | 50 | 100

Article Title (sorted by relevance)	Author(s)	Type	Date	Source
Mo1566 Comparative Analysis of the Immunohistochemistry Method Using D2-40 and CD34 Against the Routine Staining for the Detection of Lymphatic and Blood Vessel Invasion on Gastric Cancer: Correlation With Lymph Node Status	Leticia T. <b>Gresta</b> , Nayze L. Aideman, Leonardo M. Fonseca, Luisa L. Castro, et al.	Abstract	May 2012	Gastroenterology Vol. 142, Issue 5, Supplement 1, Page S-630

PDF (190 KB)

Cited in Scopus: 9

View Abstracts | Email Abstracts | Add to My Reading List | Export Citations | Number of entries per page: 20 | 50 | 100

1

ADVERTISMENT

**Subscribe today:**

**Which journal will you choose**



## Mo1564

**The Efficacy of 18F-FDG PET/CT and Wbbs in Detecting Bone Metastasis of Gastric Cancer: A Single-Center, Large-Volume Study in Korea**  
Dae Won Ma, Je-Hyun Kim, Yong Chan Lee, Tae Joo Jeon, Minjun Yun, Young Hoon Youn, Hyejin Park, Sang In Lee

**Background/Aims:** The role of 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography (PET)-computed tomography (CT) and whole body bone scan (WBBS) in identifying bone metastasis in gastric cancer is not clear. We compared the usefulness of PET-CT and WBBS in detecting bone metastasis in patient with gastric cancer. **Methods:** 1,485 patients who were diagnosed as gastric cancer and taken PET-CT or WBBS were retrospectively reviewed from January 2003 to August 2011. 114 patients were enrolled and 73.2% of the patients were confirmed as bone metastasis. Positive indicators of bone metastasis were based on following criteria: presence of multiple asymmetric foci of increased radionuclide uptake over the skeleton on either PET-CT or WBBS without reasonable explanation other than metastasis; histologic examination; comparable findings on CT or MRI; and one or more equivocal lesions on PET-CT or WBBS with obvious progression on follow up examinations. Bone metastasis was confirmed when one or more criteria were met. **Results:** The mean duration from the diagnosis of gastric cancer to skeletal metastasis was 23.2 months. 78.6% of patients with skeletal metastasis had undifferentiated histology by Japanese classification and 69.0% had metachronous bone metastasis. Most of the patients (84.5%) had multiple bone metastases and common sites were in order from the vertebra, pelvis, and ribs. The sensitivity, specificity, and accuracy of PET-CT were 88.1%, 10.0%, and 67.5% respectively. WBBS showed higher sensitivity, specificity, and accuracy than PET-CT such as 97.6%, 46.7%, and 84.2% respectively. When analyzed according to image modality, 85.7% of the patients with bone metastasis showed positive findings at both PET-CT and WBBS. Most of synchronous bone metastasis showed positive findings at both studies, however 15.5% of metachronous bone metastasis were positive at WBBS only. Based on the sites of bone metastasis, WBBS was more sensitive in detection of axial bones such as the vertebra than PET-CT. Serologic markers such as alkaline phosphatase, CEA, and CA19-9 didn't show a significant difference between two studies. The concordance rate of response after treatment between PET-CT and WBBS was low ( $k=0.116$ ). **Conclusions:** WBBS is more sensitive and specific than PET-CT for detecting bone metastasis in gastric cancer. Especially, WBBS may be more effective to detect metachronous bone metastasis than PET-CT. For tumor assessment after treatment, both studies may be complementary due to low concordance rate between two studies.

## Mo1565

**Helicobacter pylori Infection and Development of Gastric Cancer a 10-Year Follow-up Population-Based Study in a High Incidence Area**

Alireza Sadjadi, Behrooz Z. Alizadeh, Masoud Bahari, Mohammad H. Derakhshan, Emad Ahmadi, Arash Etemadi, Afshin Houshvar, Farhad Pourfarzi, Abbas Yazdanboud, Masoud Sotoudeh, Geertman H. de Bock, Reza Malekzadeh

**Backgrounds & Aim:** *H. pylori* (HP) infection is the most important etiology of gastric cancer (GC) in the world but it causes GC in only a minority of those infected. Eradication of HP can decrease the development of GC only in the subgroup of HP infected subjects without precancerous lesions. Strategies of HP eradication is still not well defined in countries with high mortality rates secondary to GC with almost universal HP infection in adults. The aim of the present study was to investigate the predictors of GC in an adult population with almost universal HP infection in an area with highest rate of gastric cancer in the world. **Methods:** 1011 healthy subjects 40 years and older, permanent residents of Ardabil and Meshginshahr districts in northwest Iran, were randomly selected and enrolled in an endoscopic screening study during 2000 to 2001 year. Data on demographics and potential risk factors were collected using a well-structured questionnaire. Upper gastrointestinal endoscopy with multiple biopsy sampling was performed to detect HP infection and endoscopic precancerous lesions. Participants have been followed up until 2011. During follow-up period data on the occurrence of GC, mortality, and cause of death were obtained from cancer and death registries, and when necessary by direct contacting to participants, and their families. The cumulative incidence and person-time incidence rate were calculated. The effect of other risk factors in addition to *H. pylori* infection on the risk of GC development were estimated by fitting multivariate hazard model using Cox proportional regression analysis, and were presented as hazard ratio (HR) and corresponding 95% confidence interval (95%CI). **Results:** During 10-year follow up, 36 participants (3.6%) developed GC yielding an incidence rate of 3.6 per 1000 person-years. The significant risk factors of GC included age over 50 (HR 4.8; 95%CI 1.4-16.2), a positive family history of stomach cancer (6.4; 3.1-13.1), smoking (3.7; 2.5-12.6), gastric atrophy (2.3; 1.0-5.1), intestinal metaplasia (4.5; 2.3-8.9) and presence of gastric ulcer (4.8; 1.9-11.5). Joint presence of precancerous lesion and one of the other risk factors significantly increased risk of stomach cancer as (46.5; 10.8-98.6) for a positive family history of stomach cancer; (27.6; 6.5-116.4) for smoking and (23.1; 16.3-105.3) for age>50. **Conclusions:** Combining the information on family history, lifestyle risk factors and the type of precancerous lesion may be helpful in order to identify high risk HP infected patients who need more intensive surveillance for early detection of GC. **Key words:** Stomach cancer, Precancerous lesions, Risk factors, *H. pylori*, Ardabil, Iran.

## Mo1566

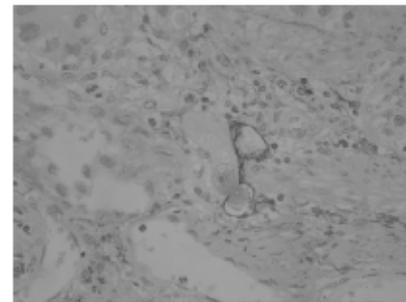
**Comparative Analysis of the Immunohistochemistry Method Using D2-40 and CD34 Against the Routine Staining for the Detection of Lymphatic and Blood Vessel Invasion on Gastric Cancer: Correlation With Lymph Node Status**  
Letícia T. Gresta, Nayze L. Aldeman, Leonardo M. Fonseca, Luisa L. Castro, Renato S. Loboizete, Mônica Maria A. Cabral

Gastric cancer (GC) is worldwide the second leading cause of cancer-related death. The TNM staging system for GC is widely used and provides important prognostic information, especially with regards to the lymph node status. The detection of lymphatic vessel invasion (LVI) on the primary tumor is the strongest risk factor for lymph node metastasis. Lymph

node metastasis is considered an independent prognostic factor for patients with GC. The evaluation of LVI with conventional Hematoxylin and Eosin (H&E) staining can generate inaccurate diagnosis, with considerable rates of false-positive and false-negative results. D2-40 is a specific monoclonal antibody for the lymphatic endothelium and is useful to identify LVI and distinguish lymphatic from true blood vessel invasion (BVI). The aim of this study are to compare the detection rates of LVI and BVI with H&E and immunohistochemistry in a series of GC specimens, and also evaluate their predictive value for the presence of lymph node metastasis. **METHODS:** Immunohistochemistry using D2-40 and CD34 was performed to study LVI and BVI in surgical specimens of a consecutive series of 99 primary GC. These results were compared to those obtained from the study of LVI and BVI by H&E. Both results were related to the presence of lymph node metastasis. **RESULTS:** From the 61 cases with LVI detected by H&E, eight were identified as false-positive by IHC. This method also detected 13 new cases of LVI, that were considered negative by H&E. BVI was identified in 38 cases (40.0%) by H&E. Immunohistochemistry confirmed only 24 (25.2%) of those cases. The comparison of LVI detected by these methods was not statistically significant. There was significant difference between these methods regarding BVI ( $p=0.02$ ). The average Kappa value determined for LVI was moderate (Kappa=0.70) and low for BVI (Kappa=0.20). The correlation between lymph node metastasis and the presence of LVI and BVI was statistically significant when evaluated by H&E ( $p=0.001$ ,  $p=0.033$ ), and immunohistochemistry ( $p=0.001$ ,  $p=0.019$ ). **CONCLUSION:** LVI was more easily identified in the D2-40 immunostained sections than in the H&E stained sections. The presence of LVI and BVI is associated with the presence of lymph node metastasis. These are morphological features of poor prognosis, probably reflecting the tumor potential for metastatic spread and aggressive behavior. Our results show that the IHC method with these two markers is superior to the conventional H&E staining for detecting LVI and BVI in GC specimens. The immunohistochemical identification of lymphatic and blood vessels is useful to increase the diagnostic accuracy of vessel invasion and to predict lymph node metastasis in GC. Diagnostic agreement between methods of detection of LVI and BVI (N=95).

		H&E	D2-40 and CD34	p VALUE	KAPPA
LVI	POSITIVE	61	66	0.38	0.50
	NEGATIVE	34	29		
BVI	POSITIVE	38	26	0.02*	0.20
	NEGATIVE	57	69		

\* statistically significant



Lymphatic vessel invasion: D2-40 highlights the lymphatic endothelium (x400).

## Mo1567

**Metachronous Gastric Cancer Risk After Endoscopic Submucosal Dissection**  
Takafumi Sugimoto, Yutaka Yamaji, Kosuke Sakurai, Yoshihiro Isomura, Shuntaro Yoshida, Atsuo Yamada, Yoshihiro Hirata, Keiji Ogura, Makoto Okamoto, Shuntaro Oht, Masao Omata, Kazuhiko Koike

**[OBJECTIVE]** Endoscopic submucosal dissection is getting certified as method to treat mucosal gastric cancer. However, after successful treatment of cancer, the residual stomach is known to have the higher risk of metachronous cancers than the stomach which is native for cancer and the risk factor of metachronous cancers is not elucidated. The aim of this study was to evaluate the risk factor of metachronous gastric cancers after endoscopic submucosal dissection (ESD) in a long-term follow-up. **[METHODS]** A total of 164 consecutive patients (male: female 122: 42, mean age 68.9 yrs) were treated by ESD from September 2000 to September 2009. Biopsy specimens were taken from the greater curvature of the antrum and middle corpus to evaluate the gastric mucosal status, including *H. pylori*, intestinal metaplasia (IM), and neutrophil infiltration (NI) before ESD. Blood samples were also collected before ESD to measure serum levels of pepsinogen I and II. Follow-up endoscopy after ESD was scheduled at 2 and 6 months, 1 year, and annually thereafter. Eradication of *H. pylori* was recommended when possible. Eradication was confirmed by a negative 13C-urea breath test following the completion of eradication therapy for 8 weeks. **[RESULTS]** The median follow-up period was 3.8 years. We found metachronous gastric cancers in 23 of 164 patients (3.7%/year). There were no local recurrences in this study group. The cumulative incidence of metachronous gastric cancer was statistically higher in IM and NI in the corpus ( $P=0.013$ ,  $0.0098$ , respectively, log-rank test). The hazard ratios of IM and NI in the corpus, and *H. pylori* eradication were 2.98, 2.72, 0.52, respectively by Cox proportional hazard model ( $P=0.022$ ,  $0.026$ ,  $0.26$ ). **[CONCLUSION]** The presence of intestinal metaplasia and neutrophil infiltration in corpus were closely related to the development of metachronous gastric cancer after ESD. Not only eradication of *H. pylori* but annual follow-up endoscopy may be important to improve the prognosis of metachronous gastric cancer.

**ANEXO E** – Certificado de apresentação oral e publicação de resumo em anais do evento

EVENTO: XXIX Congresso Brasileiro de Patologia

DATA: 14 de novembro de 2013

LOCAL: Florianópolis – SC

SOCIEDADE PROMOTORA: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

TÍTULO: Métodos de avaliação da densidade microvascular para o estudo da angiogênese e linfangiogênese no câncer gástrico

ANAIS DO EVENTO: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial



JORNAL BRASILEIRO DE

# PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

BRAZILIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE

Uma publicação conjunta das sociedades: SBPCML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica-Medicina Laboratorial), SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e SBC (Sociedade Brasileira de Citopatologia)

ISSN 2237-3446

Volume 49 - Número 6  
novembro/dezembro 2013

SUPLEMENTOS PATOLOGIA



**XXIX Congresso  
Brasileiro de Patologia**  
Florianópolis • SC  
13 a 16.11.2013



### 386 - MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR PARA O ESTUDO DA ANGIOGÊNESE E LINFANGIOGÊNESE NO CÂNCER GÁSTRICO.

Autor/ Apresentador	Instituição	Cidade	UF	País
GRESTA, LT	Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais	Belo Horizonte	MG	Brasil

Demais Autores	Instituição	Cidade	UF	País
CABRAL, MMDA	Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais	Belo Horizonte	MG	Brasil

Área de Conhecimento	Situação
Patologia Gastrointestinal	Apresentação oral

#### Resumo:

**Introdução/Objetivos** A quantificação dos fatores angiogênicos e linfangiogênicos tem sido amplamente explorada na tentativa de prever o prognóstico de diversos tipos de neoplasias. No câncer gástrico (CG), um parâmetro promissor é a determinação da densidade microvascular (DMV) linfática e sanguínea. A análise da literatura revela que a falta de padronização dos métodos de avaliação da angiogênese e linfangiogênese pode produzir variações nos valores de DMV. Nosso objetivo é avaliar os diferentes métodos utilizados para sua quantificação. **Material e Métodos** Trinta e um casos de CG foram marcados pela imuno-histoquímica (IHQ) para CD34, CD105 e D2-40. A quantificação da microvascularização foi realizada em cada um dos marcadores através da contagem dos microvasos (mv) nos "hot spots", em três aumentos microscópicos diferentes (100x, 200x e 400x). A DMV foi então calculada dividindo o número de vasos pela área do campo microscópico (em mm<sup>2</sup>) para cada aumento e para cada marcador IHQ. **Resultados/Conclusões** A DMV média obtida para CD34 foi 196 mv/mm<sup>2</sup> (100x), 303 mv/mm<sup>2</sup> (200x) e 475 mv/mm<sup>2</sup> (400x). A DMV média obtida para CD105 foi 136 mv/mm<sup>2</sup> (100x), 226 mv/mm<sup>2</sup> (200x) e 362 mv/mm<sup>2</sup> (400x). A DMV média obtida para D2-40 foi 34 mv/mm<sup>2</sup> (100x), 67 mv/mm<sup>2</sup> (200x) e 170 mv/mm<sup>2</sup> (400x). A DMV média para o aumento de 100x foi menor que para o aumento de 200x que, por sua vez, foi menor que para o aumento de 400x. Esse fato ocorreu de forma proporcional e semelhante nos três marcadores IHQ estudados. A DMV obtida para CD34 foi maior que a DMV pelo CD105. A DMV linfática obtida pelo D2-40 foi consideravelmente menor que a DMV pelo CD34 e pelo CD105. A normatização da quantificação da DMV no CG, assim como descrito para outras neoplasias, é necessária para confirmar o seu valor prognóstico.

#### Agência de Fomento:

CAPES

**ANEXO F** – Certificado de apresentação oral e publicação de resumo em anais do evento

EVENTO: XXVII Congresso Brasileiro de Patologia

DATA: 29 de outubro de 2009

LOCAL: Búzios – RJ

SOCIEDADE PROMOTORA: Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

TÍTULO: Análise comparativa da eficácia do método imuno-histoquímico (d2-40 e cd34) e coloração de rotina (HE) para detecção de invasão vascular linfática e sanguínea no carcinoma gástrico: correlação com outros indicadores prognósticos

ANAIS DO EVENTO: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

	<p><b>XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA</b> BÚZIOS - RIO DE JANEIRO 28 A 31 DE OUTUBRO DE 2009</p>	
<p>Gresta LT, Cabral MMDA</p>		
<p>Participou do XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA na qualidade de Autores do tema livre (Apresentação Oral) - "Análise comparativa da eficácia do método imuno-histoquímico (d2-40 e cd34) e coloração de rotina (HE) para detecção de invasão vascular linfática e sanguínea no carcinoma gástrico: correlação com outros indicadores prognósticos" Área: Patologia Gastrointestinal</p>		
 <p>Leila Maria Cardão Chimelli Presidente da Comissão Científica</p>	 <p>Vera Lucia Nunes Pannain Presidente do Congresso</p>	<p>Carga Horária: 37 horas</p>

JOURNAL BRASILEIRO DE

PATOLOGIA

E MEDICINA LABORATORIAL




ISSN 2176-0861  
**XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA**  
 BUZIOS - RIO DE JANEIRO  
 28 A 31 DE OUTUBRO DE 2009  


Expediente
Nossa Capa
Temas Livres

A apresentação dos Temas Livres, seja na forma de pôsteres ou de exposição oral, representa uma participação importante dentre as atividades científicas dos Congressos da Sociedade Brasileira de Patologia. Trata-se de excelente oportunidade para que sejam expostas diferentes linhas de pesquisa e para que conhecimentos sejam compartilhados, gerando o aprimoramento profissional.

Neste CD, registrado na norma ISSN (International Standard Serial Number), você encontrará os Temas Livres que foram selecionados para apresentação no XXVII Congresso Brasileiro de Patologia.

O ISSN é o identificador aceito internacionalmente para individualizar o título de uma publicação seriada, tornando-o único e definitivo. O registro deste CD na norma ISSN é uma forma de apresentação oficialmente considerada como publicação científica, para fins de currículo.

Esperamos que esta iniciativa seja um adicional de qualidade do nosso Congresso.

Atenciosamente,

Vera Pannain  
*Presidente*  
XXVII Congresso Brasileiro  
de Patologia

Lella Chimelli  
*Presidente da Comissão Científica*  
XXVII Congresso Brasileiro  
de Patologia

Sair

454 - ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICÁCIA DO MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO (D2-40 E CD34) E COLORAÇÃO DE ROTINA (HE) PARA DETECÇÃO DE INVASÃO VASCULAR LINFÁTICA E SANGUÍNEA NO CARCINOMA GÁSTRICO: CORRELAÇÃO COM OUTROS INDICADORES PROGNÓSTICOS.

Nome do Autor/Apresentador	Instituição Envolvida
GRESTA, L.T.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, MG
Nome dos demais autores	Instituições Envolvidas
CABRAL, M.M.D.A.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, MG
Área de Conhecimento	Forma de Apresentação
Patologia Gastrointestinal	APRESENTAÇÃO ORAL

#### Resumo

O carcinoma gástrico (CG) é a segunda causa de morte por câncer no mundo, sendo o TNM fator prognóstico mais importante. A invasão vascular linfática (IVL) detectada no tumor primário se correlaciona com a presença de metástases linfonodais (pN) e também é fator prognóstico independente nos pacientes com CG. A avaliação da angioinvasão apenas pela coloração de rotina (Hematoxilina e Eosina- HE) pode gerar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos. O D2-40 é específico para o endotélio linfático, sendo útil para identificar IVL e, desta forma, distinguir se a embolização tumoral se encontra em vasos sanguíneos ou linfáticos. Nosso objetivo foi analisar comparativamente a detecção de IVL e sanguínea (IVS), por HE e imunohistoquímica (IHQ), e correlacioná-las com fatores prognósticos. Métodos: realizado estudo IHQ, utilizando D2-40 (endotélio linfático) e CD34 (pan-endotelial) em 98 casos de CG para avaliar a presença de IVL e IVS. Resultados foram comparados com a detecção de IVL e IVS pela HE, e correlacionados com fatores prognósticos. Resultados: A IVL foi identificada em 62 casos (63,3%) na avaliação pela HE e em 63 (64,3%) pela IHQ. Observou-se IVS em 38 casos (38,8%) ao HE e em apenas 19 (19,4%) à IHQ. A detecção de IVS foi significativamente maior ao HE que à IHQ ( $p=0,002$ ). A concordância diagnóstica entre os métodos foi moderada para IVL ( $Kappa=0,44$ ) e baixa para IVS ( $Kappa=0,17$ ). A correlação entre IVL e pN foi significativa na avaliação pelos dois métodos ( $p=0,001$ ). A IVS se relacionou positivamente com o pN apenas pela HE ( $p=0,007$ ). Nossos resultados mostram que a aplicação do método IHQ utilizando dois marcadores combinados é superior na detecção de IVL e IVS no CG, quando comparada à coloração de rotina, podendo ter aplicação na prática médica.

## ANEXO G – Apresentação de poster e publicação de resumo em anais do evento

EVENTO: II Encontro de Patologia da UFMG

DATA: 5 a 9 de julho de 2010

LOCAL: Belo Horizonte – MG

PROMOTORA: Programa de P'os-Graduacao em Patologia da UFMG

TÍTULO: Análise comparativa da eficácia do método imuno-histoquímico (d2-40 e cd34) e coloração de rotina (HE) para detecção de invasão vascular linfática e sanguínea no carcinoma gástrico: correlação com outros indicadores prognósticos

Centro de Pós-graduação - Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais

### II Encontro de Patologia da UFMG

Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG

5 a 9 julho de 2010 - Belo Horizonte - MG

Nome: Letícia Trivellato Gresta  
 Email: letrivellato@gmail.com  
 Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais  
 Nível: Mestrado  
 Cidade: Belo Horizonte  
 Estado: Minas Gerais

#### **Análise comparativa da eficácia do método imuno-histoquímico (D2-40 e CD34) e coloração de rotina (HE) para detecção de invasão vascular linfática e sanguínea no carcinoma gástrico: correlação com outros indicadores prognósticos**

Gresta, L.T., Cabral, M.M.D.A.

Universidade Federal de Minas Gerais

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma gástrico (CG) é a segunda causa de morte por câncer no mundo, sendo o estadiamento TNM o fator prognóstico mais importante, em especial a presença de metástases linfonodais. A invasão vascular linfática (IVL) se correlaciona com a ocorrência de metástases linfonodais e é fator prognóstico independente no CG. A sua avaliação pela coloração de rotina hematoxilina e eosina (HE) pode gerar resultados falso-positivos e falso-negativos. D2-40 é um anticorpo específico para endotélio linfático, útil para identificar IVL e distingui-la da sanguínea. **OBJETIVOS:** Nosso objetivo foi analisar comparativamente a detecção de IVL e IVS pelos métodos de HE e imuno-histoquímica (IHQ) em uma série de CG e correlacioná-la com os demais fatores prognósticos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foi realizado estudo IHQ em cortes seriados, utilizando D2-40 (endotélio linfático) e CD34 (pan-endotelial) em 95 casos de CG para avaliar a presença de IVL e IVS. Os resultados obtidos à IHQ foram comparados com a detecção pela HE. Os dados clínico-patológicos e a presença de IVL e IVS foram correlacionados com a ocorrência de metástases linfonodais. **RESULTADOS:** A detecção de IVL foi maior que a de IVS. Sessenta e um casos (64,2%) apresentaram IVL na avaliação pela HE, e 66 (69,5%) pela IHQ. Dos 61 casos com IVL ao HE, 8 eram falso-positivos à IHQ. A IHQ detectou IVL em 13 casos considerados negativos ao HE. A IVS foi evidenciada em 38 casos (40,0%) pela HE e em apenas 24 (25,2%) pela IHQ. Foram identificados, pela análise à IHQ, 24 falso-positivos e 10 falso-negativos para IVS. A comparação entre a detecção de IVL pelos dois métodos não mostrou diferença significativa. Houve diferença estatisticamente significativa entre a detecção de IVS ao HE e à IHQ ( $p=0,02$ ). A concordância diagnóstica entre os métodos foi moderada para IVL ( $Kappa=0,50$ ) e baixa para IVS ( $Kappa=0,20$ ). A correlação da presença de metástases linfonodais com IVL e IVS foi estatisticamente significativa, tanto pela HE ( $p=0,001$ ,  $p=0,013$ ), quanto pela IHQ ( $p=0,001$ ,  $p=0,019$ ). **CONCLUSÃO:** A presença de IVL e IVS está relacionada à presença de metástases linfonodais no CG. Nossos resultados mostram que a aplicação do método IHQ utilizando dois marcadores combinados é superior na detecção de IVL e IVS no CG, quando comparada à coloração de rotina pela HE, podendo ter grande aplicação na prática médica.

