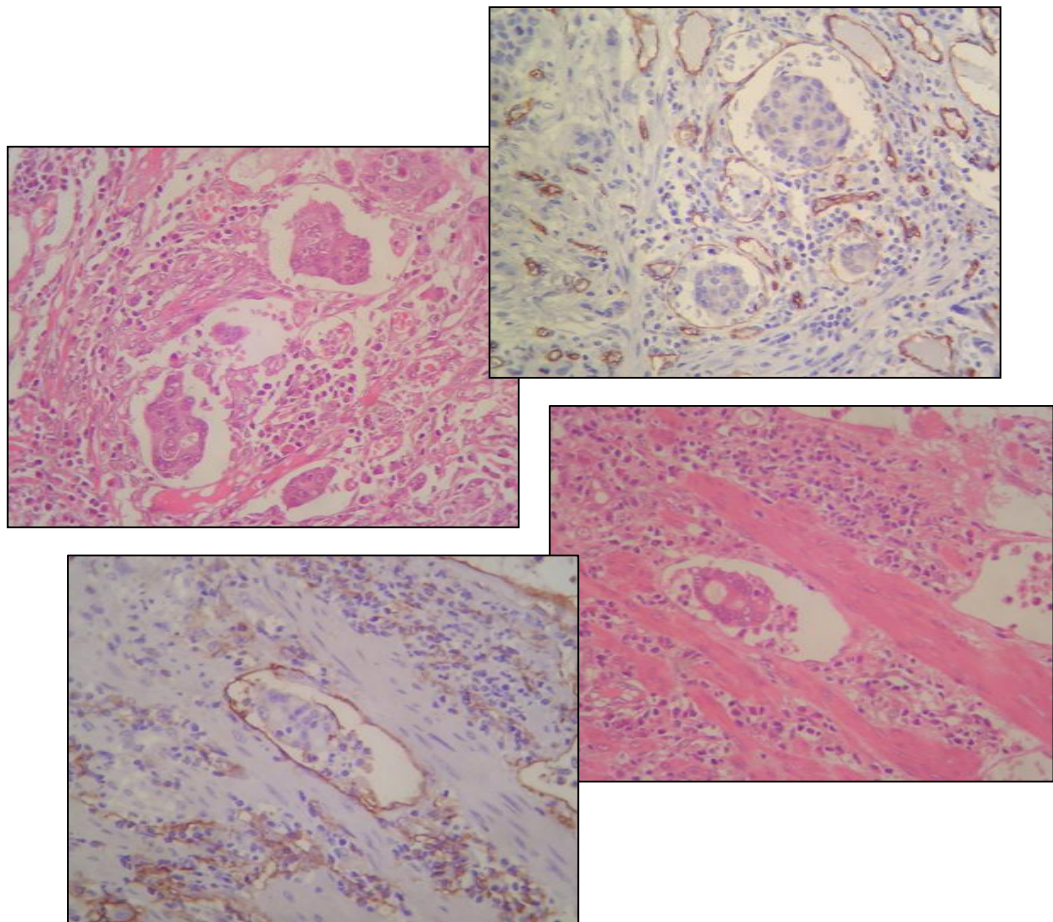


LETÍCIA TRIVELLATO GRESTA

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

correlação com outros indicadores prognósticos



Belo Horizonte

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal

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

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

correlação com outros indicadores prognósticos

Letícia Trivellato Gresta

Belo Horizonte

2010

LETÍCIA TRIVELLATO GRESTA

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

correlação com outros indicadores prognósticos

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

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia Médica

ORIENTADORA: Profa. Dra. Mônica Maria Demas Álvares Cabral

Belo Horizonte

2010

Gresta, Leticia Trivellato.
G832a Análise comparativa da eficácia do método imuno-histoquímico (D2-40 e CD34) e da coloração de rotina (HE) para detecção de invasão vascular linfática e sanguínea no carcinoma gástrico [manuscrito]; correlação com outros indicadores prognósticos. / Leticia Trivellato Gresta. - - Belo Horizonte: 2010.
98f.: il.
Orientadora: Mônica Maria Demas Álvares Cabral.
Área de concentração: Patologia Médica.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Gástricas. 2. Estadiamento de Neoplasias. 3. Metástase Linfática. 4. Imunoistoquímica. 5. Prognóstico. 6. 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. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Elizabeth Ribeiro da Silva

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Francisco José Penna

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL

Prof^a. Paula Vieira Teixeira Vidigal

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Prof. Wagner Luiz Tafuri

SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Prof. Geovanni Dantas Cassali

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Prof. Anílton César Vasconcelos

Prof. Edilberto Nogueira Mendes

Prof^a. Helenice Gobbi

Prof. Marcelo Vidigal Caliarì

Enio Ferreira (Disc.Titular)

Izabela Amorim (Disc.Suplente)



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

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Monica Maria Demas Álvares Cabral, Paulo Roberto Savassi Rocha, Alfredo José Afonso Barbosa, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“ANALISE COMPARATIVA DA EFICÁCIA DO MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO (D2-40 E CD34) E COLORAÇÃO DE ROTINA (HE) PARA DETECÇÃO DE INVAÇÃO VASCULAR LINFÁTICA E SANGUINEA NO CARCINOMA GÁSTRICO”**, apresentada pela mestrand **LETICIA TRIVELLATO GRESTA** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Medica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Monica Maria Demas Álvares Cabral
Orientadora

Prof. Paulo Roberto Savassi Rocha

Prof. Alfredo José Afonso Barbosa



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

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LETICIA TRIVELLATO GRESTA, nº de registro 2008652674. Às oito horas do **dia vinte e dois do mês de fevereiro de dois mil e dez**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ANALISE COMPARATIVA DA EFICÁCIA DO MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO (D2-40 E CD34) E COLORAÇÃO DE ROTINA (HE) PARA DETECÇÃO DE INVAÇÃO VASCULAR LINFÁTICA E SANGUINEA NO CARCINOMA GÁSTRICO.”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Medica. Abrindo a sessão, a Presidente da comissão, Profa. Monica Maria Demas Álvares Cabral/Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Monica Maria Demas Álvares Cabral/Orientadora
Prof. Paulo Roberto Savassi Rocha
Prof. Alfredo José Afonso Barbosa

Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG

Indicação: aprovada
Indicação: aprovada
Indicação: aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2010.

Profa. Monica Maria Demas Álvares Cabral/Orientadora Monica Maria Demas Álvares Cabral

Prof. Paulo Roberto Savassi Rocha Paulo Roberto Savassi Rocha

Prof. Alfredo José Afonso Barbosa Alfredo José Afonso Barbosa

Prof. Wagner Luiz tafuri/Coordenador Wagner Luiz tafuri

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

Wagner Luiz tafuri
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

*À querida professora Ana Margarida,
com saudades...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, por ter me dado saúde, força e proteção para realizar os meus sonhos.

Aos meus pais, Remo Gresta e Maria Mazzarello, pela pessoa que sou e que ainda quero ser, pelo carinho, pela educação e amizade. Agradeço por terem me ensinado o valor do trabalho e a virtude da gratidão.

Ao meu Norte, Ismael, pelo amor possível e impossível, pela inspiração para continuar acreditando e trilhando o caminho só nosso. A Agulha sempre aponta para o Norte.

À vovó Dulce, por ter me ensinado que curiosidade e sabedoria são qualidades que se complementam, e não podem ser afastadas.

Aos meus familiares queridos, pelos momentos de alegria e cumplicidade em família, onde podemos ser simplesmente nós mesmos.

A todos os professores do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, pela oportunidade de aprender a minha profissão.

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali, Coordenador do Laboratório de Patologia Comparada do ICB – UFMG, por nos ter ajudado com tanta prontidão e generosidade, cedendo os anticorpos utilizados neste trabalho.

À Profa. Lúcia Porto Fonseca de Castro do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo apoio incondicional, pela amizade e pela ajuda na realização de todas as reações imuno-histoquímicas.

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

Aos colegas patologistas do Laboratório Analys, pelo incentivo ao estudo e ao constante aperfeiçoamento profissional.

Aos colegas da pós-graduação, colegas da Residência, funcionários e amigos do Departamento de Anatomia Patológica pelos tantos anos de convivência e experiências compartilhadas.

Aos alunos da graduação da Faculdade de Medicina, estagiários do Laboratório de Anatomia Patológica do IML – BH e do Laboratório Analys, muitos deles agora colegas de profissão, com quem aprendi muito mais do que ensinei.

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

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira, pelo exemplo de profissional dedicada ao ensino, à pesquisa e à assistência, com o mesmo entusiasmo e competência. Agradeço por ter acreditado em mim desde a época da Residência Médica e me dado a chance de aprender com uma mestra indescritível. Sou grata pelos ensinamentos e pela amizade, espero ter conseguido concluir o nosso projeto da maneira imaginada.

À Profa. Mônica Maria Demas Álvares Cabral, por ter me recebido de braços abertos para a orientação, sem hesitar. Agradeço a amizade, a confiança, o respeito e a cumplicidade que tivemos nesses dois anos de trabalho e que só foi aumentando. Obrigada pelas incontáveis horas dedicadas a esta conquista, que significa para mim muito mais que um título.

“All I know is this: Once I was blind, and now I can see”

Evangélio segundo São João 9, 25.

RESUMO

INTRODUÇÃO: o carcinoma gástrico (CG) 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 (IVL) detectada no tumor primário se correlaciona com a ocorrência de metástases linfonodais e é também considerada fator prognóstico independente nos pacientes com CG. A avaliação da angioinvasão realizada apenas pela coloração de rotina hematoxilina e eosina (HE) pode gerar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos. O D2-40 é um anticorpo monoclonal específico para endotélio linfático, sendo assim útil para identificar IVL e, desta forma, distinguir se a embolização tumoral se encontra em vasos sanguíneos ou linfáticos. **OBJETIVOS:** nosso objetivo foi analisar comparativamente a detecção de IVL e sanguínea (IVS), pela HE e pela imuno-histoquímica (IHQ) com marcação por D2-40 e CD34 em uma série de CG e correlacioná-las com os demais fatores prognósticos. **MATERIAL E MÉTODOS:** foi realizado estudo IHQ em cortes seriados, utilizando os marcadores D2-40 (endotélio linfático) e CD34 (pan-endotelial) em 95 casos consecutivos de CG para avaliar a presença de IVL e IVS. Os resultados obtidos pela análise à IHQ foram comparados com a detecção de IVL e IVS pela HE, e correlacionados com outros fatores prognósticos. 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 consideravelmente maior que a de IVS. Sessenta e um casos (64,2%) apresentaram IVL na avaliação pela HE, que foi identificada em 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 que haviam sido 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 casos falso-positivos e 10 casos falso-negativos para IVS. A comparação entre a detecção de IVL por ambos os 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 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 ($p=0,001$, $p=0,019$). A presença de metástases linfonodais se correlacionou ainda com: a profundidade de infiltração tumoral além da submucosa (CG avançado) ($p=0,001$), a classificação histológica de Laurén quando comparados os tipos difuso e misto/não classificável ($p=0,017$) e a invasão de órgãos por continuidade (esôfago e duodeno) ($p=0,026$). Os fatores clínico-patológicos relacionados à presença de IVL foram: topografia do tumor no terço distal do estômago ($p=0,039$), tipo macroscópico de Borrmann ($p=0,001$), invasão de órgãos por continuidade ($p=0,003$) e profundidade tumoral ($p=0,001$). Em contrapartida, a presença de IVS correlacionou-se apenas com a profundidade tumoral ($p=0,003$). **CONCLUSÃO:** a presença de IVL e IVS está relacionada à presença de metástases linfonodais no CG. A presença de IVL está associada a outros fatores de pior prognóstico nos tumores, como 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. Nossos resultados mostram que a aplicação do método IHQ utilizando esses 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.

Palavras-chave: Carcinoma gástrico, Estadiamento TNM, Metástases linfonodais, Fatores prognósticos, Invasão vascular linfática, Invasão vascular sanguínea, Imuno-histoquímica, CD34, D2-40.

ABSTRACT

BACKGROUND: Worldwide, gastric carcinoma (GC) is the second largest cause of cancer-related death. The TNM staging system for GC 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 GC. 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 carcinoma, TNM staging, Lymph node metastasis, Predictive factor, Lymphatic invasion, Blood vessel invasion, Immunohistochemistry, CD34, D2-40.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Características clínico-patológicas da amostra | 58 |
| TABELA 2. Revisão histopatológica dos casos | 60 |
| TABELA 3. Correlação entre a classificação histológica de Laurén e a profundidade tumoral em 95 casos de carcinoma gástrico | 62 |
| TABELA 4. Avaliação da invasão vascular linfática pelos métodos de HE e IHQ..... | 64 |
| TABELA 5. Avaliação da invasão vascular sanguínea pelos métodos de HE e IHQ | 64 |
| TABELA 6. Comparação entre a concordância diagnóstica na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela HE e pela IHQ | 65 |
| TABELA 7. Correlação entre a detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela HE e IHQ e a presença de metástases linfonodais | 68 |
| TABELA 8. Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a presença de metástases linfonodais | 70 |
| TABELA 9. Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e as presenças de invasão vascular linfática e sanguínea pela IHQ | 73 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Classificação macroscópica do carcinoma gástrico precoce segundo a Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva. Tipos: protuso (polipóide), superficial (elevado, plano e deprimido) e ulcerado (escavado) 28
- FIGURA 2.** Classificação macroscópica do carcinoma gástrico avançado segundo Borrmann. Tipos: polipóide (vegetante), ulcerado expansivo (fungado), úlcero-infiltrativo (ulcerado) e infiltrativo (difuso) 28
- FIGURA 3.** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago) 30
- FIGURA 4.** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago) 30
- FIGURA 5.** 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 43
- FIGURA 6.** Diagrama esquemático ilustrando os possíveis fatores preditivos de metástases linfonodais, no qual se destacam os linfáticos intra e peritumorais e a linfangiogênese 44
- FIGURA 7.** Mapa de Clivagem para o processamento das peças cirúrgicas de carcinoma gástrico: amostragem para exame histológico 51

- FIGURA 8.** 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) 63
- FIGURA 9.** Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular linfática em 95 casos de CG 66
- FIGURA 10.** Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular sanguínea em 95 casos de CG 66
- FIGURA 11.** Fotomicrografias de cortes seriados de invasão vascular linfática detectada apenas pela IHQ e de falsa invasão vascular diagnosticada ao HE. **A e B:** IVL marcação por D2-40 (x400); **C:** falsa IVL HE (x100); **D:** falsa IVL marcação por D2-40 (x100) 67

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| GRÁFICO 1. Correlação entre faixa de idade dos pacientes e tipo de carcinoma gástrico, segundo a classificação histológica de Laurén | 61 |
|---|----|

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| QUADRO 1. Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico | 53 |
| QUADRO 2. Resultados dos coeficientes de concordância de Kappa de acordo com a classificação de Landis & Koch | 55 |

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

DVL – Densidade vascular linfática

Dr. – Doutor

Dra. – Doutora

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

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

LVI – *lymph vessel invasion*

µm – Micrômetros

M – Avaliação clínica de metástases hematogênicas segundo o TNM

N – Avaliação clínica de metástases linfonodais segundo o TNM

NC – Não classificável segundo Lauren
OMS – Organização Mundial de Saúde
P.A. – Pureza Analítica
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
Prof. – Professor
Profa. – Professora
SBP – Sociedade Brasileira de Patologia
SJED – Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva
SOE – Sem outra especificação
T – Avaliação clínica da profundidade de invasão tumoral segundo o TNM
TNF α – 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
VEGFR-3 – Receptor do Fator de crescimento C derivado do endotélio vascular
VPN – Valor preditivo negativo
VPP – Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 Justificativa | 22 |
| 1.2 Objetivos | 24 |
| | |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 25 |
| 2.1 Aspectos clínico-patológicos do carcinoma gástrico | 25 |
| 2.1.1 <i>Classificação histológica do carcinoma gástrico</i> | 25 |
| 2.1.2 <i>Avaliação macroscópica do carcinoma gástrico</i> | 27 |
| 2.1.3 <i>Fatores epidemiológicos relacionados ao carcinoma gástrico</i> | 29 |
| 2.1.4 <i>Fatores etiológicos relacionados ao carcinoma gástrico</i> | 31 |
| 2.1.5 <i>Aspectos gerais relacionados à carcinogênese gástrica</i> | 33 |
| 2.2 Aspectos prognósticos clássicos do carcinoma gástrico | 35 |
| 2.2.1 <i>Tipo histológico e prognóstico do câncer gástrico</i> | 35 |
| 2.2.2 <i>Importância do estadiamento anatomopatológico no carcinoma gástrico</i> ... | 36 |
| 2.2.3 <i>O papel do rastreamento endoscópico no diagnóstico do carcinoma gástrico</i> | 39 |
| 2.3 Neoformação vascular linfática e sanguínea na carcinogênese gástrica | 41 |
| 2.3.1 <i>Angiogênese e carcinogênese</i> | 41 |
| 2.3.2 <i>Linfangiogênese no carcinoma gástrico</i> | 42 |
| 2.4 Novos parâmetros prognósticos na avaliação do carcinoma gástrico: importância prognóstica da invasão vascular linfática e sanguínea | 45 |
| 2.5 Métodos de avaliação de invasão vascular | 47 |
| 2.5.1 <i>Problemas na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela coloração de rotina por HE</i> | 47 |
| 2.5.2 <i>Perspectivas da aplicação do método imuno-histoquímico na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea</i> | 48 |
| | |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 50 |
| 3.1 Seleção dos casos | 50 |
| 3.2 Estudo morfológico dos tumores primários | 52 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Estudo imuno-histoquímico | 52 |
| 3.4 Avaliação de invasão vascular | 54 |
| 3.4.1 <i>Avaliação de invasão vascular pela coloração de HE</i> | 54 |
| 3.4.2 <i>Avaliação de invasão vascular pela coloração de IHQ</i> | 54 |
| 3.5 Análise estatística | 55 |
| | |
| 4 RESULTADOS | 57 |
| 4.1 Características gerais da amostra | 57 |
| 4.1.1 <i>Características clínico-patológicas dos casos</i> | 57 |
| 4.1.2 <i>Revisão histopatológica</i> | 59 |
| 4.1.3 <i>Correlação entre as variáveis clínico-patológicas idade e profundidade tumoral com a classificação histológica de Laurén</i> | 60 |
| 4.2 Avaliação de invasão vascular linfática e sanguínea | 62 |
| 4.2.1 <i>Invasão vascular linfática e invasão vascular sanguínea</i> | 62 |
| 4.2.2 <i>Comparação da eficácia dos métodos de HE e IHQ na identificação de invasão vascular</i> | 65 |
| 4.3 Correlação com metástases linfonodais e outras variáveis prognósticas | 68 |
| 4.3.1 <i>Correlação entre invasão vascular e metástases linfonodais</i> | 68 |
| 4.3.2 <i>Valor preditivo da invasão vascular linfática e sanguínea para metástases linfonodais</i> | 69 |
| 4.3.3 <i>Correlação entre variáveis clínico-patológicas e metástases linfonodais</i> | 69 |
| 4.3.4 <i>Correlação entre variáveis clínico-patológicas e invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela IHQ</i> | 72 |
| | |
| 5 DISCUSSÃO | 75 |
| | |
| 6 CONCLUSÃO | 83 |
| | |
| PERSPECTIVAS FUTURAS | 84 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 85 |
| | |
| APÊNDICES | 94 |
| | |
| ANEXOS | 96 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

A incidência do carcinoma gástrico (CG) exhibe tendência global de declínio nas últimas décadas. Entretanto, ainda figura como a quarta neoplasia mais freqüente e a segunda maior causa de morte por câncer em todo o mundo. As estimativas brasileiras produzidas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para 2010 não são diferentes. O número de casos novos de câncer de estômago estimados no Brasil para o ano de 2010 foi de 13.820 para a população masculina e 7.680 para a feminina. Esses valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e de 8 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.

O prognóstico do CG baseia-se essencialmente no seu estadiamento em relação à profundidade de invasão tumoral e à presença de metástases linfonodais. Estas características, aliadas a outros aspectos patológicos, definem os rumos do

tratamento. Portanto, a abordagem cirúrgica com propósitos curativos, envolvendo gastrectomia com linfadenectomia, é considerada a única intervenção capaz de prolongar a sobrevida.

A presença de invasão vascular linfática (IVL) no tumor primário tem sido considerada fator de risco independente para a ocorrência de metástases linfonodais em diversos tipos de neoplasia. Embora tenha havido grande avanço no estudo dos mecanismos que levam à progressão tumoral e à produção de metástases, as pesquisas envolvendo invasão vascular e suas formas de detecção no CG se baseiam, muitas vezes, em métodos fragmentados e incompletos, aliados à falta de interpretação global dos resultados.

O presente estudo tem como propósito definir o valor da análise da IVL e da invasão vascular sanguínea (IVS) pelo método imuno-histoquímico (IHQ) em uma amostra abrangente de pacientes com CG e a sua possível aplicação nos procedimentos propedêuticos de rotina.

Apesar da notável agressividade do CG em fases avançadas, devemos ter em mente que minimizar a quantidade de procedimentos invasivos é essencial para melhorar a qualidade de vida do paciente. Tratamentos menos radicais, como a ressecção endoscópica sem esvaziamento linfonodal (mucosectomia ou dissecação da submucosa), têm sido cada vez mais aplicados em casos altamente selecionados de CG precoce. Para que se possa prescindir da linfadenectomia nesses casos, é necessário excluir com absoluta segurança a presença de IVL ou IVS no tumor primário.

Por todas essas razões, a avaliação adequada do potencial metastático da neoplasia é um dos fatores mais importantes para o tratamento do câncer gástrico e para a sobrevida dos pacientes.

1.2 Objetivos

- ✓ Analisar comparativamente a eficácia na detecção de IVL e IVS pelo método de coloração de rotina pela Hematoxilina e Eosina (HE) e após a marcação IHQ em uma série de casos de CG;
- ✓ Avaliar a presença de IVL e IVS e sua relação com a presença de metástases linfonodais;
- ✓ Correlacionar características clínico-patológicas dos pacientes com a presença de IVL e IVS;
- ✓ Correlacionar características clínico-patológicas dos pacientes com a ocorrência de metástases linfonodais.

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 (Coleman *et al.*, 1993; Fenoglio-Preiser *et al.*, 1996). 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 (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). 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 (Laurén, 1965; Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). Ambos baseiam-se nos aspectos morfológicos característicos das biópsias e peças cirúrgicas de CG, identificados apenas ao exame histopatológico.

Segundo Laurén, 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.

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 (Laurén, 1965; Laurén, 1991).

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 (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). Esta classificação é basicamente descritiva, não refletindo o comportamento biológico da neoplasia (Carneiro, 1997).

Outra classificação morfológica simples foi proposta por Ming, baseada no padrão de crescimento da neoplasia (Ming, 1977). 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 (Luebke *et al.*, 2005).

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 (Lemes *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2008).

A localização mais freqüente do CG é na pequena curvatura antral do terço distal do estômago (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). 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 (Kim *et al.*, 1998).

A classificação macroscópica do CG precoce é fortemente relacionada aos critérios utilizados para a classificação endoscópica da Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva (SJED) (Japanese Gastric Cancer Association, 1998). Ela apresenta três categorias distintas, que podem estar combinadas em alguns tumores (FIG.1). O tipo I, chamado protuso, identifica tumores que formam proeminência na mucosa gástrica, com morfologia polipóide. 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 freqüente dentre os CG precoces (Moreaux, Bougaran, 1993).

O CG avançado pode ser classificado em quatro padrões de apresentação macroscópica (Borrmann, 1926). O tipo I, chamado polipóide 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.2).

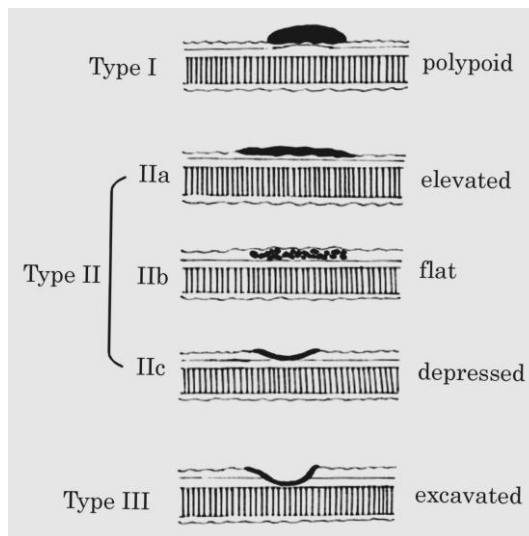


FIGURA 1: Classificação macroscópica do carcinoma gástrico precoce segundo a Sociedade Japonesa de Endoscopia Digestiva. Tipos: protuso (polipóide), superficial (elevado, plano e deprimido) e ulcerado (escavado).

FONTE: Japanese Classification of Gastric Carcinoma (1998).

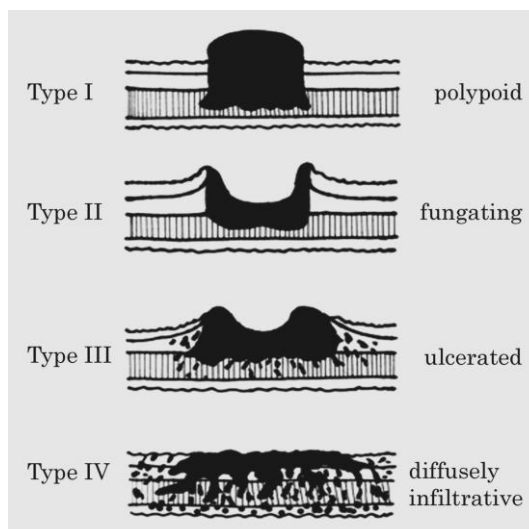


FIGURA 2: Classificação macroscópica do carcinoma gástrico avançado segundo Borrmann. Tipos: polipóide (vegetante), ulcerado expansivo (fungado), úlcero-infiltrativo (ulcerado) e infiltrativo (difuso).

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 (Hohenberger, Gretschel, 2003; Brenner *et al.*, 2009). Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento, sendo maior no sexo masculino que no feminino (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000).

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 (Forman, Burley, 2006). Nos últimos 50 anos, a incidência do CG vem sofrendo queda gradual e contínua, devido particularmente a 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 (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000; Correa, Piazzuelo *et al.*, 2006).

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 (INCA, 2009). O câncer de estômago em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Norte e Nordeste, o terceiro na região Centro-Oeste e, nas regiões Sul e Sudeste, o quarto (FIG.3). Em relação às mulheres, é o terceiro mais freqüente na Região Norte, o quarto na Região Nordeste e, nas demais regiões, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, é o quinto mais incidente (FIG.4).

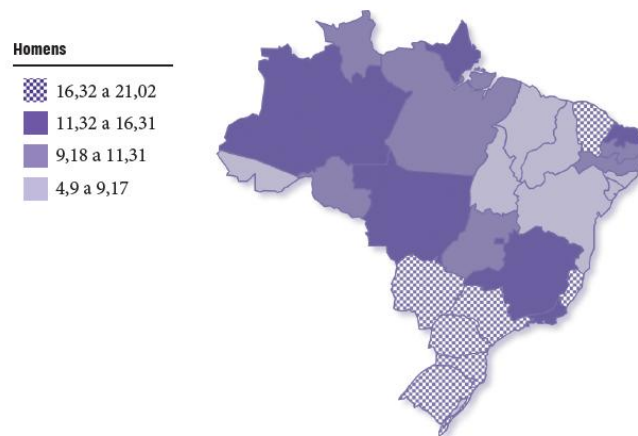


FIGURA 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago).

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

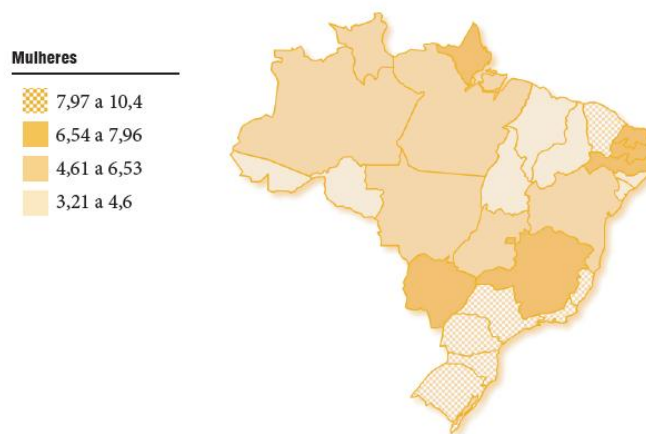


FIGURA 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago).

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

O número de casos novos de câncer de estômago estimado para o Brasil no ano de 2010 é de 13.820 para a população masculina e 7.680 para a feminina. Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos para cada 100 mil homens e 8 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2009).

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 (Carneiro, 1997; Hohenberger, Gretschel, 2003). 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 nas últimas décadas (Forman, Burley, 2006). Pacientes do sexo masculino são mais acometidos, numa média de idade em torno dos 60 anos. O tipo difuso é relativamente mais freqüente nas populações de baixo risco, acomete igualmente ambos os sexos, com idade média em torno dos 50 anos, apresentando pior prognóstico. Não houve modificação significativa em sua prevalência nas últimas décadas (Laurén, Nevalainen, 1993).

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 (Kamangar *et al.*, 2006). 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 (Forman, Burley, 2006).

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 (Hohenberger, Gretschel, 2003). 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 (Correa, Piazzuelo *et al.*, 2006).

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 (Correa, Haenszel *et al.*, 1975; Joossens, Geboers, 1981). Os efeitos da dieta excessivamente rica em sal estão associados a alterações inflamatórias e reparativas, com conseqüente indução de atrofia na mucosa gástrica (Correa, 1992). O sal em excesso pode também contribuir para aumentar a capacidade mutagênica de alimentos ricos em nitrosaminas (Correa, Haenszel *et al.*, 1975). Nitrosaminas são compostos com potencial cancerígeno, provenientes da transformação de nitratos e nitritos, presentes em alguns alimentos e na saliva, dentro do ambiente gástrico (Joossens, Hill *et al.*, 1996). 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 (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000).

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 (Marshall, Warren, 1984; Taylor, Blaser, 1991). 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 (Blaser, Chyou *et al.*, 1995; Correa, 1995; Warren, 2000).

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 (Queiroz *et al.*, 1998; Cabral *et al.*, 2007).

2.1.5 Aspectos gerais relacionados à carcinogênese gástrica

Dentre os diversos modelos propostos para a carcinogênese gástrica, destaca-se o de Pelayo Correa (Correa, 1992). 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* (Correa, Houghton, 2007). 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) (Correa, Piazuolo *et al.*, 2006). Em contrapartida, o CG tipo difuso de Laurén não mostra relação seqüencial tão significativa com os fatores ambientais, estando predominantemente associado a fatores genéticos (Ming, 1998; Tahara, 2004).

Nesta seqüência, o *H. pylori* atua em diversas etapas do processo da carcinogênese gástrica, gerando estímulo contínuo à inflamação, à proliferação celular e às alterações gênicas (Correa, Piazuolo, 2008). 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 (Wilson, Crabtree, 2007). 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 (Correa, Houghton, 2007).

O *H. pylori* apresenta entre suas amostras grande diversidade genética que amplia suas possibilidades de adaptação ao hospedeiro (Jiang, Hiratsuka *et al.*, 1996). Na grande maioria da população infectada, prevalece o estado de equilíbrio entre os fatores de agressão da bactéria e de defesa do hospedeiro (Blaser, Chyou *et al.*, 1995; Warren, 2000). 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 cyclooxygenase-2 (COX-2) e óxido-nítrico sintetase (iNOS), do fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e de interleucinas (IL) que atuam como potentes fatores quimiotáticos e ativadores de macrófagos e neutrófilos (Wilson, Crabtree, 2007). Além do mais, as amostras *cagA*-positivas são as mais comumente observadas no CG (Blaser, Chyou *et al.*, 1995; Queiroz *et al.*, 1998).

Estudos sobre a infecção crônica da mucosa gástrica pelo *H. pylori* e sua relação com a carcinogênese gástrica, conduzidos por nosso grupo de pesquisa, confirmaram que a infecção por amostras *cagA*-positivas está associada às condições pré-cancerosas, como atrofia e metaplasia intestinal (Cabral *et al.*, 2006). 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 (Cabral *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2007).

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 (Carneiro, 1997). 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 (Laurén, 1965; Laurén, 1991; Robert, *et al.*, 2008). 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 (Rodrigues *et al.*, 2000). 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 (Jentschura, Winkler *et al.*, 1997). 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 (Nogueira *et al.*, 2000).

O significado da classificação de Ming relaciona-se ao potencial invasivo do CG (Ming, 1977). 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 em melhores taxas de sobrevivência do que as que se verificam nas neoplasias com crescimento do tipo infiltrativo (Luebke *et al.*, 2005).

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 (Cimerman *et al.*, 1994.).

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 (Sobin, Wittekind *et al.*, 2002; Greene, American Joint Committee on Cancer. *et al.*, 2002) (ANEXO 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 (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). O estudo anatomopatológico convencional dos espécimes cirúrgicos de CG consiste basicamente na determinação dos parâmetros T (pT) e N (pN) (Robert *et al.*, 2008).

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 (Hohenberger, Gretschel, 2003). 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 (Japanese Gastric Cancer Association, 1998). 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 (Sobin, Wittekind *et al.*, 2002). 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) (Nakajima, 2002; Shimada, 2004).

A sobrevida em cinco anos de pacientes com CG precoce pode ultrapassar a taxa de 90%, quando o tratamento for adequado (Hohenberger, Gretschel, 2003). Em contrapartida, em pacientes com neoplasias mais avançadas, estas taxas são menores que 20% (Furukawa *et al.*, 2002; Kodera *et al.*, 2008).

O acometimento dos linfonodos regionais perigástricos é o fator prognóstico mais importante do CG (Kim *et al.*, 1998; Siewert *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 2004). 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 (Mullaney *et al.*, 2002; Hohenberger, Gretschel, 2003; Coburn, 2009).

A incidência geral de metástases linfonodais no CG precoce está entre 10% a 15%. 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 submucosa (An, Baik *et al.*, 2007). Nos CG

avançados, a presença de metástases linfonodais ocorre em até 44% dos tumores no estágio T2 e até 64% no estágio T3 (Hohenberger, Gretschel, 2003).

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 (Folli, Morgagni *et al.*, 2001; An, Baik *et al.*, 2007).

Estudos com grande número de casos de CG precoce no Japão, submetidos a gastrectomia com linfadenectomia, revelaram que nenhum dos 1230 tumores intramucosos e bem diferenciados com menos de 3,0 cm apresentava metástases linfonodais ao exame anatomopatológico (Gotoda *et al.*, 2000). Nestes casos selecionados, há consenso na literatura de que a gastrectomia com linfadenectomia seria um 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%) (Hohenberger, Gretschel, 2003).

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 (Greene, American Joint Committee on Cancer. *et al.*, 2002). Se um número insuficiente de linfonodos for obtido, existe a chance de o paciente ser considerado inapropriadamente livre de metástases linfonodais (Uña, 2009). Este paciente, portanto, seria classificado em um 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 (Mullaney *et al.*, 2002).

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 (De Gara, Hanson *et al.*, 2003). 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% (Kamangar *et al.*, 2006).

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 (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). A endoscopia digestiva alta é o método de rastreamento mais eficaz para a detecção do CG e de suas lesões precursoras (De Vries *et al.*, 2007).

Em países orientais onde o CG é comum, como Japão e Coréia, aproximadamente 80% das neoplasias detectadas em programas de rastreamento endoscópico são precoces (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000). Enquanto no Japão a proporção de casos de CG precoce corresponde a 40% do total diagnosticado, na Europa equivale apenas a 15% (Hohenberger, Gretschel, 2003).

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 (Ono, 2006; Yasuda, 2006). 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 (Hyung, Cheong *et al.*, 2004; An, Baik *et al.*, 2007; Hanaoka *et al.*, 2009). As indicações propostas para a ressecção endoscópica são: adenocarcinoma diferenciado, lesão menor que 2,0 cm, sem ulceração no tumor e sem envolvimento de vasos linfáticos e sanguíneos, já que metástases linfonodais são raras em neoplasias com essas características (Ono, 2006; An, Baik *et al.*, 2007). 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 (Hyung, Cheong *et al.*, 2004).

2.3 Neoformação vascular linfática e sanguínea na carcinogênese gástrica

2.3.1 Angiogênese e carcinogênese

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 (Tonini, Rossi *et al.*, 2003; Folkman, 2006). As células neoplásicas invadem os vasos neoformados e são transportadas a outros sítios no organismo, podendo produzir metástases (Weidner, 2002). Portanto, quanto maior a quantidade de vasos neoformados em determinada área, definida como densidade microvascular sanguínea (DMV), maiores seriam as possibilidades de invasão vascular e metastatização em alguns tipos de neoplasia (Weidner, 2000). O desenvolvimento de novo vaso sanguíneo é um fenômeno complexo e resultado de seqüência de eventos envolvendo fatores de crescimento produzidos por células neoplásicas e intersticiais (Bussolino, Mantovani *et al.*, 1997). Entretanto, os mecanismos que controlam o início da angiogênese ainda não estão totalmente elucidados (Gupta, Qin, 2003).

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 (Bergers, Benjamin, 2003; Ribatti, Nico *et al.*, 2007). 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 (Nyberg, Xie *et al.*, 2005; Neufeld, Kessler, 2006).

Estudos de caráter experimental revelam que a ativação do fenótipo angiogênico ocorre nas fases mais precoces do desenvolvimento tumoral (Naumov, Akslen *et al.*, 2006; Naumov, Bender *et al.*, 2006). A angiogênese precede e é necessária para a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (Weidner, 2004).

2.3.2 Linfangiogênese no carcinoma gástrico

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 (Kitadai *et al.*, 2005).

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. A partir da maior disponibilidade destes marcadores, o papel da linfangiogênese no desenvolvimento e na disseminação tumoral tem sido melhor elucidado (Kato *et al.*, 2006).

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 (Nakamura *et al.*, 2006). A DVL avaliada em áreas peritumorais, mas não intratumorais, é fator de risco para metástases linfonodais nos CG avançados (Gao *et al.*, 2008).

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 (Ji, 2006).

Os vasos linfáticos da mucosa gástrica normal estão presentes mais profundamente na lâmina própria. A DVL encontrada na submucosa é bastante similar à da mucosa e à da muscular própria (Sako *et al.*, 2006). Em contraste, a muscular da mucosa exibe DVL aproximadamente dez vezes maior que as demais camadas da parede gástrica normal, como demonstrado na Figura 5 (Sako *et al.*, 2006).

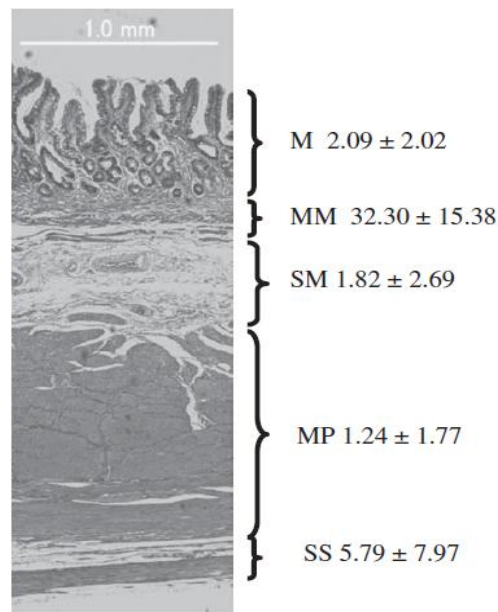


FIGURA 5: Densidade Vascular Linfática nas diferentes camadas da parede gástrica normal. Média \pm DP de 30 pontos (por milímetro quadrado). M: mucosa; MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; MP: muscular própria; SS: subserosa.

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

Em consequência da distribuição dos linfáticos na parede gástrica, a presença de IVL é mais freqüentemente observada na camada muscular da mucosa nos CG precoces (Sako *et al.*, 2006). 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 (Yonemura *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008). 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.

Diversos fatores morfológicos e funcionais contribuem para o comportamento biológico e o potencial metastático da neoplasia (FIG. 6). 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 (Ji, Kato, 2003; Ji, 2006; Coşkun, Akyürek *et al.*, 2009).

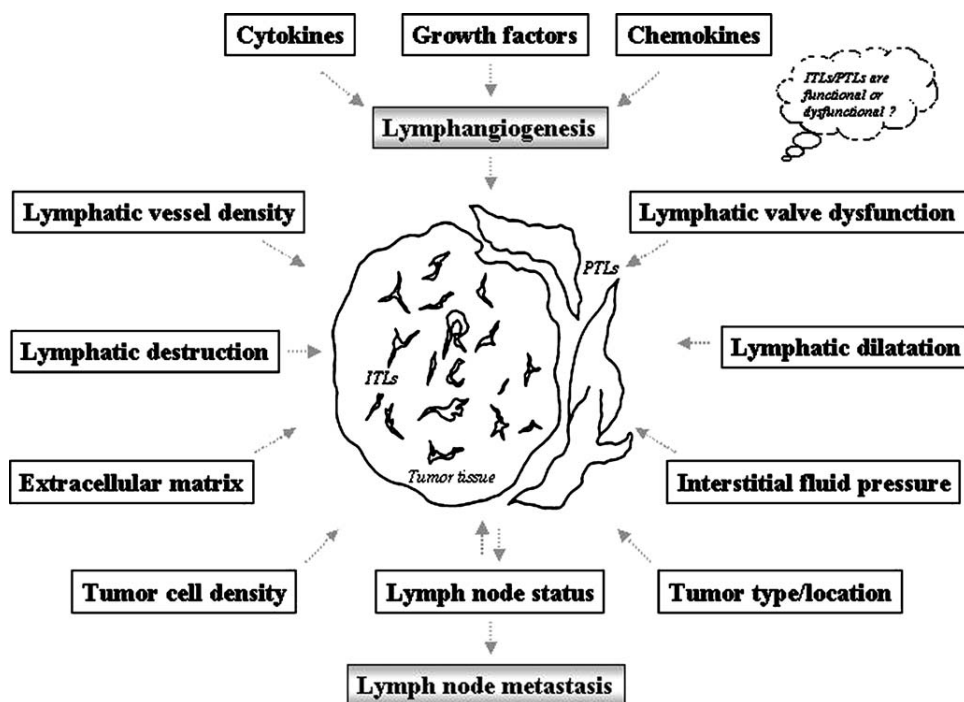


FIGURA 6: Diagrama esquemático ilustrando os possíveis fatores preditivos de metástases linfonodais, no qual se destacam os linfáticos intra e peritumorais e a linfangiogênese. *ITLs: intratumoral lymphatics; PTLs: peritumoral lymphatics.*

FONTE: Rui-Cheng Ji (2006).

2.4 Novos parâmetros prognósticos na avaliação do carcinoma gástrico: importância prognóstica da invasão vascular linfática e sanguínea

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, IVL e IVS (Maehara, Orita *et al.*, 1992; Folli, Morgagni *et al.*, 2001; An, Baik *et al.*, 2007; Kwee, Kwee, 2008; Morita, Ishikawa *et al.*, 2009).

A IVL é considerada fator preditivo da ocorrência de metástases linfonodais em diversas neoplasias malignas, como o carcinoma mamário (Tezuka, Onoda *et al.*, 2007), carcinomas de células renais (Ishikawa, Aida *et al.*, 2007), adenocarcinoma colorretal (Ishii, Ota *et al.*, 2009) e prostático (Roma, Magi-Galluzzi *et al.*, 2006). A IVL ou IVS pelas células tumorais é pré-requisito para a disseminação neoplásica via redes linfática e sanguínea (Pantel, Brakenhoff, 2004). 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 (Li, Lu *et al.*, 2008; Kim, Park *et al.*, 2009).

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 (Talamonti *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006; Sako *et al.*, 2006). A presença de IVL também indica evolução desfavorável mesmo nos pacientes livres de metástases linfonodais (pN0) em neoplasias como o câncer

de mama e o CG (Arnaout-Alkarain, Kahn *et al.*, 2007; Lee, Wu *et al.*, 2007; Ichikawa, Kubota *et al.*, 2009).

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 (Nasu, Nishina *et al.*, 2006). 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 (Song, Park *et al.*, 2004; Son, Song *et al.*, 2005; Ichikawa, Kubota *et al.*, 2009).

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

2.5 Métodos de avaliação de invasão vascular

A invasão vascular pelas células neoplásicas pode ser avaliada nas regiões peritumorais e intratumorais do CG, utilizando-se coloração rotineira pela HE e também a IHQ com marcadores que possuem diferente especificidade para os tipos de endotélio sanguíneo e linfático. Os dois métodos revelam aplicação variável nas pesquisas científicas, com resultados heterogêneos em relação à IVL e IVS no CG.

2.5.1 Problemas na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea pela coloração de rotina por HE

A pesquisa de IVS e IVL tumoral na prática da patologia cirúrgica tem sido feita habitualmente pelo exame microscópico de cortes histológicos da lesão tumoral corados pela coloração de rotina HE. Diversos estudos analisam a presença de IVS e IVL como fator prognóstico no CG utilizando apenas esta coloração (Gotoda *et al.*, 2001; Talamonti *et al.*, 2003; An, Baik *et al.*, 2007; Li, Lu *et al.*, 2008; Liu, Zhang *et al.*, 2008; Shen, Huang *et al.*, 2009). Entretanto, a acuidade das informações obtidas destas análises é bastante questionável, devido às dificuldades inerentes à sua interpretação.

Geralmente, a IVL é identificada com base na histologia convencional com coloração pela HE, e o seu diagnóstico feito pela presença de êmbolo tumoral dentro de canais vasculares revestidos por camada única de células endoteliais, sem conteúdo de hemácias (Yonemura *et al.*, 2006). Entretanto, a obliteração completa do lúmen vascular por células neoplásicas pode não ser visível ao HE e não ser diagnosticada como IVL. Por outro lado, artefatos de retração devido à fixação do

tecido, que circundam agregados de células tumorais, podem ser inadvertidamente considerados como IVL verdadeira.

O diagnóstico de invasão vascular feito ao HE revela falta de especificidade em alguns aspectos, como na incapacidade de distinguir vasos linfáticos de vasos sanguíneos corretamente (Sako *et al.*, 2006; Van Den Eynden, Van Der Auwera *et al.*, 2006).

Estudos que abordam a variabilidade interobservador na avaliação de IVL e IVS no câncer colorretal revelam baixa concordância entre os patologistas no diagnóstico de IVL e IVS quando se utiliza o método de coloração de rotina pela HE (Harris *et al.*, 2008).

2.5.2 Perspectivas da aplicação do método imuno-histoquímico na detecção de invasão vascular linfática e sanguínea

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

A invasão linfática pelas células neoplásicas avaliada apenas pela coloração de rotina pode gerar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos (Sako *et al.*, 2006; Yonemura *et al.*, 2006). Em contrapartida, a maioria dos estudos que avaliou a presença IVL e IVS no CG até então não utilizou marcação específica para os vasos linfáticos, mas apenas marcadores pan-endoteliais, como CD31, CD34 ou Fator VIII (Del Casar *et al.*, 2008). Desta forma, não seria possível distinguir se a embolização tumoral se encontra em vasos sanguíneos ou vasos linfáticos (Van Den Eynden, Van Der Auwera *et al.*, 2006).

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

Entre os marcadores pan-endoteliais, o CD34 é amplamente utilizado em diferentes estudos de angiogênese, sendo considerado atualmente o melhor marcador vascular, quando comparado ao CD31 e ao Fator VIII (Elpek *et al.*, 2000; Tenderenda *et al.*, 2001). No entanto, estudos para avaliar invasão vascular tumoral utilizando apenas o CD34, em detrimento a outros marcadores, têm produzido resultados inconsistentes e incompletos. A principal restrição à sua utilização como marcador isolado é o fato dele não ser capaz de distinguir vasos sanguíneos de linfáticos (Van Den Eynden, Van Der Auwera *et al.*, 2006).

Quanto ao método de avaliação da invasão de vasos linfáticos e/ou sanguíneos, a maioria dos autores relata maior detecção de êmbolos neoplásicos quando o método IHQ foi utilizado (Arigami *et al.*, 2005; Sako *et al.*, 2006; Hanaoka, Tanabe *et al.*, 2009; Kim, Park *et al.*, 2009; Morita, Ishikawa *et al.*, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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 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 2000 a 2006. Todos os pacientes foram submetidos a gastrectomia total, subtotal ou parcial, e a linfadenectomia.

Os casos selecionados foram obtidos a partir da análise retrospectiva de um total de 222 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 (ANEXO B). O protocolo anatomopatológico foi criado com o objetivo de padronizar o estudo macro e microscópico de todas as peças de gastrectomia realizadas em pacientes com câncer gástrico (Lemes *et al.*, 2003). O protocolo compreende a avaliação macro e microscópica da neoplasia, incluindo: as medidas do tumor, o tipo macroscópico de Borrmann (Borrmann, 1926), a localização, o tipo histológico segundo a classificação de Laurén (Laurén, 1965) e da OMS (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000), o padrão de crescimento descrito por Ming (Ming, 1977), a presença de IVL e IVS e estadiamento

anatomopatológico pelo TNM (Greene, American Joint Committee on Cancer. *et al.*, 2002).

Todas as amostras retiradas das peças de gastrectomia para o estudo histopatológico, de acordo com o mapa de clivagem do protocolo do APM (FIG. 7), haviam sido fixadas em formol P.A. a 10% e processadas rotineiramente no APM, estando incluídas em blocos de parafina.

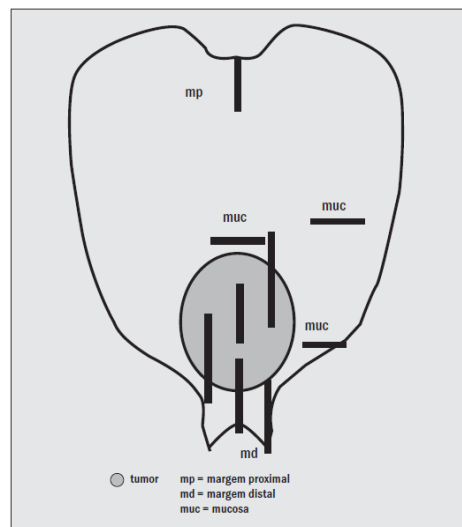


FIGURA 7: Mapa de Clivagem para o processamento das peças cirúrgicas de carcinoma gástrico: amostragem para exame histológico.
FONTE: Lemes (2003).

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 foram excluídos 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: a classificação histológica do tumor segundo Laurén (Laurén, 1965), o padrão de crescimento (Ming, 1977), o grau histológico de diferenciação, a classificação do tipo histológico do tumor segundo a OMS (Aaltonen, Hamilton *et al.*, 2000) e a profundidade do tumor, segundo o sistema TNM (Greene, American Joint Committee on Cancer. *et al.*, 2002).

A revisão de todas as lâminas foi realizada por duas médicas 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 (seqüenciais) 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) e CD34 (marcador pan-endotelial), 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 |

QUADRO 1: Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico.

A técnica IHQ utilizada foi da estreptavidina-biotina peroxidase (Dako LSAB®+ System), de acordo com o método preconizado pelo Manual de Imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) (Alves, Bacchi *et al.*, 1999).

Todas as lâminas foram submetidas ao pré-tratamento em solução tampão a 98°C em panela a vapor por 20 minutos, para recuperação antigênica. Foram realizados bloqueios da peroxidase endógena e da proteína avidina, por 15 minutos cada. Os anticorpos primários D2-40 e CD34 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

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 seqüencial das lâminas e simultânea por duas médicas 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 (Van Den Eynden, Van Der Auwera *et al.*, 2006). 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 Análise estatística

O banco de dados do estudo e todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS Statistics 17.0 (SPSS, Inc, Chicago, III). O valor de p considerado estatisticamente significativo foi de $<0,05$. O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para correlacionar a variável quantitativa idade com as variáveis categóricas (metástases linfonodais e invasão vascular).

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 (Landis, Koch, 1977). O Quadro 2 revela os valores do coeficiente de Kappa de acordo com a classificação de Landis & Koch.

| Valor do coeficiente de Kappa | Classificação da concordância segundo Landis & Koch |
|--------------------------------------|--|
| < 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).

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.

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 2 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 8

pacientes. Foi observada invasão por continuidade do duodeno em 23 pacientes, do esôfago em 8 e de ambos em 3 pacientes. As características clínico-patológicas da amostra estão representadas na Tabela 1.

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

| Dados Clínico-patológicos | N = 95 (%) |
|--------------------------------------|-------------------|
| Gênero | |
| <i>masculino</i> | 62 (65,3) |
| <i>feminino</i> | 33 (34,7) |
| Tipo de cirurgia | |
| <i>Gastrectomia parcial</i> | 12 (12,6) |
| <i>Gastrectomia subtotal</i> | 57 (60,0) |
| <i>Gastrectomia total</i> | 26 (27,4) |
| Topografia do tumor | |
| <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) |
| Curvatura acometida | |
| <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) |
| Tipo macroscópico | |
| <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)

| Dados Clínico-patológicos | N = 95 (%) |
|------------------------------------|------------|
| Profundidade do tumor (pT) | |
| <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) |
| Metástases linfonodais (pN) | |
| <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) |
| Metástases à distância (pM) | |
| <i>pMx</i> | 87 (91,6) |
| <i>pM1</i> | 8 (8,4) |
| Invasão de órgãos | |
| <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 (N=95).

| Dados Histopatológicos | N = 95 (%) |
|-------------------------------------|------------|
| Tipo histológico de Laurén | |
| <i>intestinal</i> | 45 (47,4) |
| <i>difuso</i> | 25 (26,3) |
| <i>misto/NC</i> | 25 (26,3) |
| Tipo histológico da OMS | |
| <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) |
| Padrão de crescimento (Ming) | |
| <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 Correlação 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 os 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.

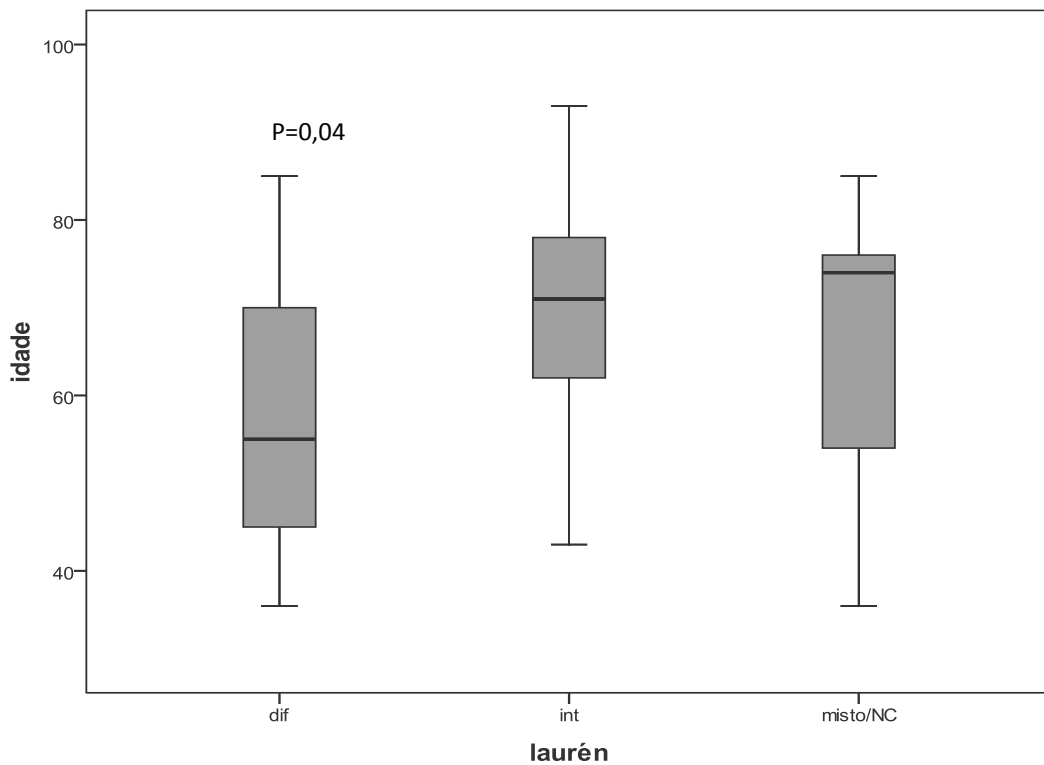


GRÁFICO 1: Correlação entre faixa de idade dos pacientes e tipos de carcinoma gástrico, segundo a classificação histológica de Laurén. dif: difuso; int: intestinal; misto/NC: misto/não classificável.

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: Correlação 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 (%) | |
| Intestinal | 11 (24) | 34 (76) | 0,108 |
| Difuso | 8 (32) | 17 (68) | } 0,034* |
| Misto/NC | 2 (8) | 23 (92) | |
| Total | 21 | 74 | |

* diferença entre os valores estatisticamente significativa

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.8).

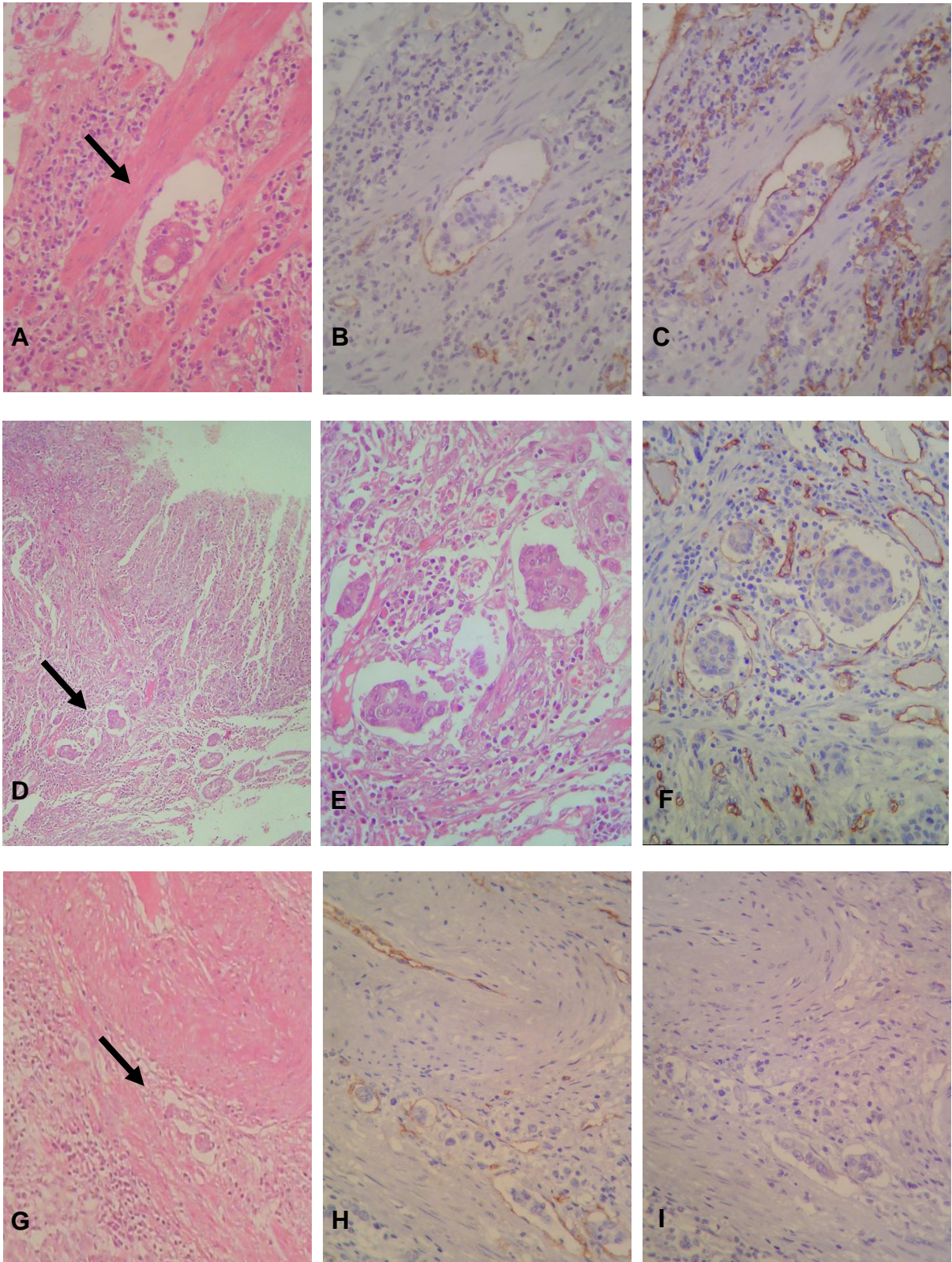


FIGURA 8: Fotomicrografias dos cortes seriados de invasão vascular linfática e sanguínea detectadas pela HE (seta) e IHQ. **A:** IVL HE (x400). **B:** IVL marcação por CD34 (x400). **C:** IVL marcação por D2-40 (x400). **D:** IVS HE (x100). **E:** IVS HE (x400). **F:** IVS marcação por CD34 (x400). **G:** IVS HE (x200). **H:** IVS marcação por CD34 (x200) **I:** IVS marcação por D2-40 (x200).

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

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
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> |
|------------|-----------------|------------------------|------------------------|-------------------|--------------|
| IVL | Positivo | 61 | 66 | 0,38 | 0,50 |
| | Negativo | 34 | 29 | | |
| IVS | Positivo | 38 | 26 | 0,02* | 0,20 |
| | Negativo | 57 | 69 | | |

* diferença entre os valores foi estatisticamente significativa

IVL: invasão vascular linfática

IVS: invasão vascular sanguínea

HE: coloração de rotina HE

IHQ: método imuno-histoquímico

A análise da Figura 9 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.

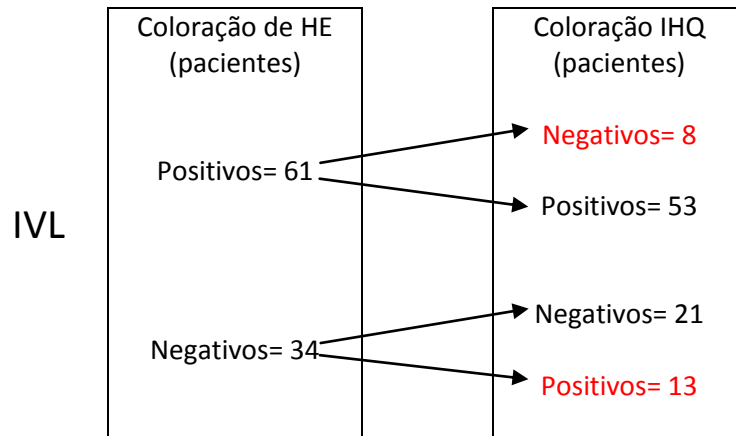


FIGURA 9: Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular linfática pela em 95 casos de CG.

A Figura 10 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.

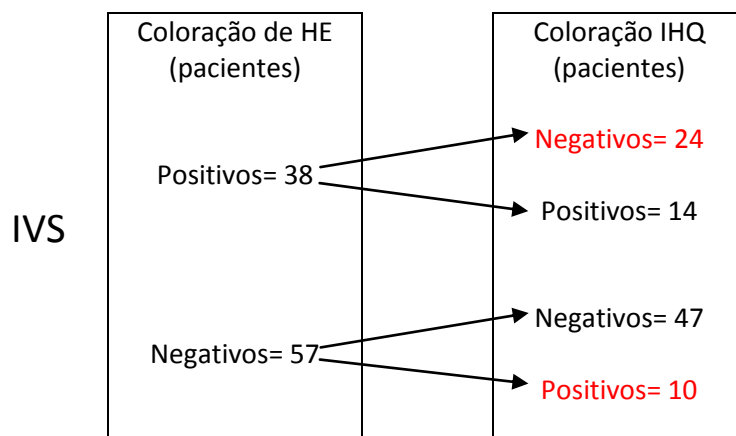


FIGURA 10: Comparação da eficácia entre HE e IHQ como métodos diagnósticos na detecção de invasão vascular sanguínea pela em 95 casos de CG.

Alguns exemplos de IVL não detectada ao exame histopatológico convencional (HE) estão demonstrados na Figura 11, bem como um caso em que a IVL detectada ao HE não foi confirmada pelo exame IHQ.

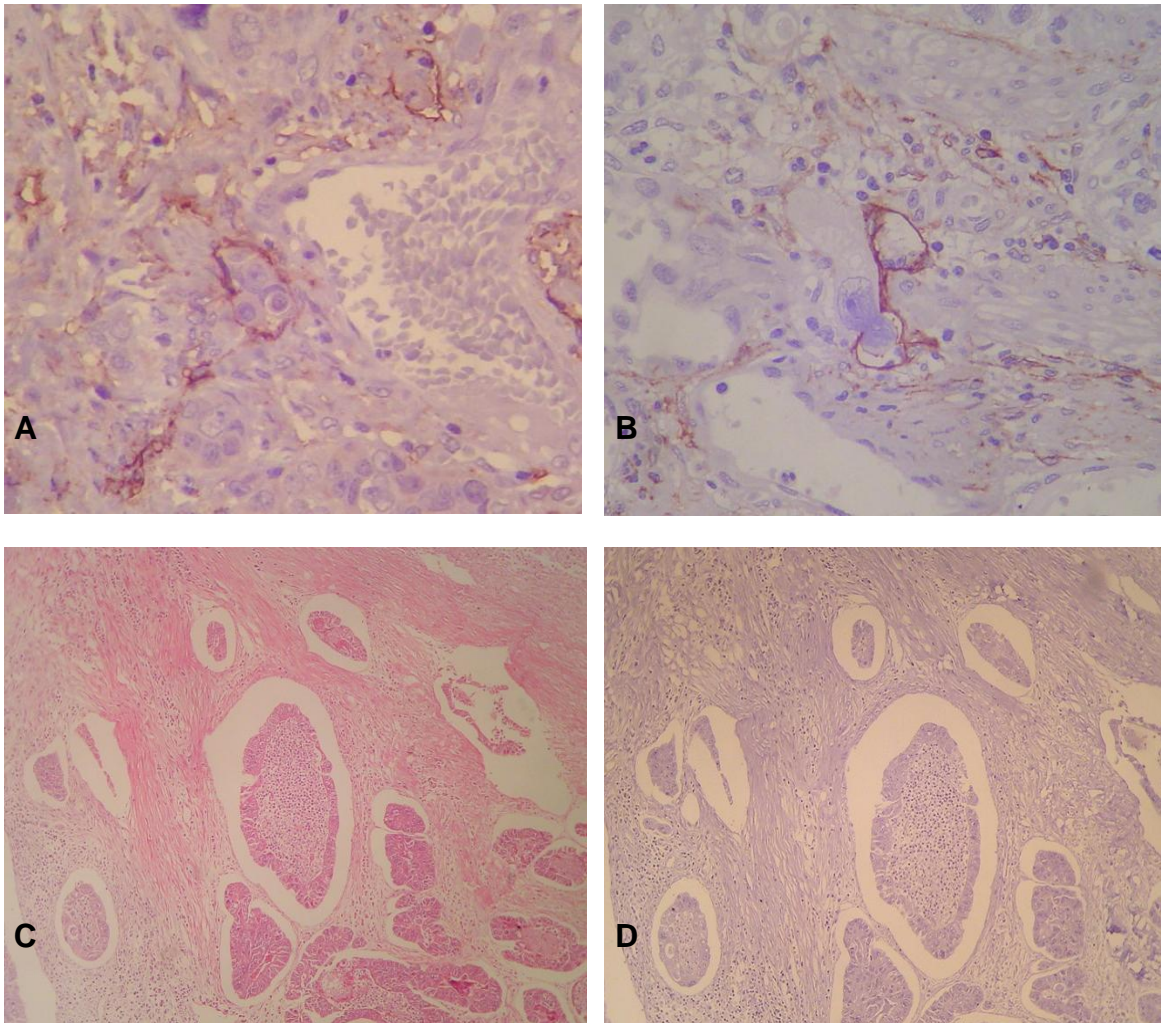


FIGURA 11: Fotomicrografias de cortes seriados de invasão vascular linfática detectada apenas pela IHQ e de falsa invasão vascular diagnosticada ao HE. **A e B:** IVL marcação por D2-40 (x400); **C:** falsa IVL HE (x100); **D:** falsa IVL marcação por D2-40 (x100).

4.3 Correlação com metástases linfonodais e outras variáveis prognósticas

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.

4.3.1 Correlação entre invasão vascular e metástases linfonodais

A correlação 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.

TABELA 7: Correlação 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) | 0,001* |
| | Positiva | 5 (8,8) | 52 (91,2) | |
| IVL - IHQ | Negativa | 20 (74,0) | 7 (26,0) | 0,001* |
| | Positiva | 8 (13,0) | 54 (87,0) | |
| IVS - HE | Negativa | 22 (41,5) | 31 (58,5) | 0,013* |
| | Positiva | 6 (16,6) | 30 (83,4) | |
| IVS - IHQ | Negativa | 25 (38,5) | 40 (61,5) | 0,019* |
| | Positiva | 3 (12,5) | 21 (87,5) | |

* diferença entre os valores estatisticamente significativa

4.3.2 Valor preditivo da invasão vascular linfática e sanguínea para metástases linfonodais

Quando analisamos os dados de invasão vascular como fator preditivo para metástases linfonodais, separadamente para HE e IHQ em uma tabela 2x2, podemos obter informações de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

Em relação à IVL, os resultados acima foram bastante semelhantes entre os métodos de HE e IHQ. A sensibilidade foi de 85,0% para a avaliação ao HE e de 88,0% para a IHQ. A especificidade foi de 82,0% quando avaliada ao HE e de 71,0% à IHQ. O VPP foi de 91,0% ao HE e 87,0% à IHQ. O VPN foi de 72,0% ao HE e 74,0% à IHQ.

Em relação à IVS, os resultados obtidos também mostraram valores semelhantes entre os métodos de HE e IHQ. Entretanto, a sensibilidade foi baixa tanto para a avaliação ao HE quanto à IHQ (49,0% e 34,0%). A especificidade foi de 78,0% quando avaliada ao HE e de 89,0% à IHQ. O VPP foi de 83,0% ao HE e 87,0% à IHQ. O VPN foi também baixo em ambos, de 41,0% ao HE e 38,0% à IHQ.

4.3.3 Correlação entre variáveis clínico-patológicas e metástases linfonodais

O teste de Mann-Whitney U para variável quantitativa não demonstrou correlação estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes e a presença de metástases linfonodais ($p=0,94$).

As neoplasias precoces exibiram menor número de metástases linfonodais, quando comparadas às neoplasias avançadas: 11,2% contra 83,0% ($p=0,001$). De

acordo com a classificação histológica de Laurén, os tumores do tipo difuso apresentaram menor proporção de acometimento linfonodal que os demais tipos: 52,0% contra 68,0% para os intestinais e 84,0% para os mistos/NC. Somente quando excluímos os tumores do tipo intestinal desta análise, pudemos obter uma relação significativa dos tumores difuso e misto/NC com a presença de metástases linfonodais ($p=0,017$).

Houve diferença estatisticamente significativa entre os tumores com invasão de órgãos por continuidade (esôfago e duodeno) e aqueles confinados ao estômago, em relação à presença de metástases linfonodais ($p=0,026$).

Não observamos correlação entre presença de metástases linfonodais com as seguintes características: idade, gênero dos pacientes, topografia do tumor, curvatura acometida, tipo macroscópico de Borrmann ou da SJED e o padrão de crescimento tumoral de Ming. Esses dados estão sumariados na Tabela 8.

TABELA 8: Correlação entre os parâmetros clínico-patológicos e a presença de metástases linfonodais (N=89).

| Dados Clínico-patológicos | Metástases linfonodais | | Valor de <i>P</i> |
|------------------------------------|------------------------|-----------|-------------------|
| | Negativo | Positivo | |
| | N (%) | N (%) | |
| Gênero | | | |
| <i>masculino</i> | 18 (31,5) | 39 (68,5) | 0,974 |
| <i>feminino</i> | 10 (31,2) | 22 (68,8) | |
| Topografia do tumor | | | |
| <i>Terço proximal</i> | 3 (25) | 9 (75) | 0,572 |
| <i>Terço médio</i> | 6 (50) | 6 (50) | |
| <i>Terço distal</i> | 17 (34) | 33 (66) | |
| <i>Terço médio+distal</i> | 1 (16,6) | 5 (83,4) | |
| <i>Terço proximal+médio+distal</i> | 1 (14,2) | 6 (85,8) | |
| <i>JEG</i> | 0 | 1 | |

(Continuação)

| Dados Clínico-patológicos | Metástases linfonodais | | Valor de <i>P</i> |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | Negativo N (%) | Positivo N (%) | |
| Curvatura acometida | | | |
| <i>pequena curvatura</i> | 16 (30,7) | 36 (59,3) | 0,109 |
| <i>grande curvatura</i> | 4 (44,4) | 5 (55,6) | |
| <i>pequena e grande</i> | 1 (8,3) | 13 (91,7) | |
| Tipo macroscópico (precoce) | | | |
| <i>SJED IIa</i> | 2 (100) | 0 | 0,487 |
| <i>SJED IIb</i> | 5 (100) | 0 | |
| <i>SJED IIc</i> | 2 (100) | 0 | |
| <i>SJED III</i> | 3 (75,0) | 1 (25,0) | |
| Tipo macroscópico (avançado) | | | |
| <i>Borrmann I</i> | 3 (50,0) | 3 (50,0) | 0,08 |
| <i>Borrmann II</i> | 7 (24,0) | 22 (76,0) | |
| <i>Borrmann III</i> | 4 (14,8) | 23 (85,2) | |
| <i>Borrmann IV</i> | 0 | 10 (100) | |
| Invasão de órgãos | | | |
| <i>Negativa</i> | 23 (45,0) | 28 (55,0) | 0,026* |
| <i>Duodeno</i> | 4 (17,4) | 19 (82,6) | |
| <i>Esôfago</i> | 1 (12,5) | 7 (87,5) | |
| <i>Esôfago + duodeno</i> | 0 | 3 (100) | |
| <i>Outros</i> | 0 | 4 (100) | |
| Profundidade do tumor | | | |
| <i>precoce</i> | 16 (88,2) | 2 (11,2) | 0,001* |
| <i>avançado</i> | 12 (16,9) | 59 (83,0) | |
| Tipo histológico de Laurén | | | |
| <i>intestinal</i> | 13 (31,7) | 28 (68,3) | 0,06 |
| <i>difuso</i> | 11 (47,8) | 12 (52,1) | |
| <i>misto/NC</i> | 4 (16,0) | 21 (84,0) | |
| Padrão de crescimento (Ming) | | | |
| <i>expansivo</i> | 11 (30,0) | 27 (70,0) | 0,28 |
| <i>infiltrativo</i> | 7 (18,4) | 31 (81,6) | |

* diferença entre os valores estatisticamente significativa

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

O teste de Mann-Whitney U para a variável quantitativa idade demonstrou correlação estatisticamente significativa com a presença de IVL detectada à IHQ ($p=0,05$), porém não para a presença de IVS ($p=0,46$).

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 correlação 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 correlação com a presença de IVS. Os dados estão demonstrados na tabela 9.

TABELA 9: Correlação entre os 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> |
| Gênero | | | | | | |
| <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) | |
| Topografia do tumor | | | | | | |
| <i>Terço distal</i> | 15 (27,3) | 40 (72,7) | 0,039* | 42 (76,3) | 13 (23,7) | 0,281 |
| <i>Demais localizações</i> | 14 (35) | 26 (65) | | 29 (72,5) | 11 (27,5) | |
| Curvatura acometida | | | | | | |
| <i>pequena curvatura</i> | 19 (35,2) | 35 (64,8) | 0,122 | 41 (76) | 13 (24) | 0,131 |
| <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) | |
| Tipo macroscópico (prec.) | | | | | | |
| <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 | |
| Tipo macroscópico (avanç) | | | | | | |
| <i>Borrmann I</i> | 5 (71,4) | 2 (28,6) | 0,001* | 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) | |
| Invasão de órgãos | | | | | | |
| <i>Negativa</i> | 26 (45,6) | 31 (54,4) | 0,003* | 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) | |
| Profundidade do tumor | | | | | | |
| <i>Precoce</i> | 17 (80,9) | 4 (19,1) | 0,001* | 21 (100) | 0 | 0,003* |
| <i>Avançado</i> | 12 (16,2) | 62 (83,8) | | 50 (67,5) | 24 (32,5) | |
| Tipo histológico de Laurén | | | | | | |
| <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) | |

(Continuação)

| Dados Clínico-patológicos | IVL – IHQ | | | IVS – IHQ | | |
|------------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|
| | Negativo | Positivo | <i>p</i> | Negativo | Positivo | <i>p</i> |
| Padrão de cresc. (Ming) | | | | | | |
| <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) | |
| Metástases à distância (pM) | | | | | | |
| <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
NA: não avaliado

5 DISCUSSÃO

Com o propósito de aprimorar a pesquisa de invasão vascular no CG, usualmente feita com a coloração de rotina pela HE, e de distinguir IVL de IVS, introduzimos o método IHQ utilizando a combinação de dois marcadores: um deles específico para o endotélio de vasos linfáticos (D2-40) e outro pan-endotelial (CD34). Além de permitir a comparação da eficácia na detecção de IVL e IVS, este método também possibilitou a avaliação do valor preditivo da invasão vascular no CG para a ocorrência de metástases linfonodais.

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 freqüente correspondendo ao tipo intestinal de Laurén (47,4%).

Ainda de acordo com séries de trabalhos publicados a respeito, 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 ($p=0,04$). 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 a 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 (Laurén, 1965).

Em nosso estudo, 53,7% dos casos de CG já se encontravam 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 (Lemes *et al.*, 2003). 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% (Maehara, Oshiro *et al.*, 1995; Setälä, Kosma *et al.*, 1996; Hyung, Cheong *et al.*, 2004; Nasu, Nishina *et al.*, 2006; Kamata, Ishikawa *et al.*, 2009; Morita, Ishikawa *et al.*, 2009). 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 uma taxa mais elevada de detecção de IVL à IHQ, quando comparada à coloração pela HE, reforçando assim o seu papel na análise da invasão vascular no CG (Arigami *et al.*, 2005; Sako *et al.*, 2006; Yonemura *et al.*, 2006).

Ao compararmos a detecção de IVL em cortes seqüenciais 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. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ao Teste de McNemar ($p=0,38$). Entretanto, quando avaliamos a tabela de qui-quadrado 2x2, podemos observar que,

apesar da IVL ao HE ter sido positiva em 61 casos, apenas 53 deles obtiveram confirmação à IHQ. Os 8 casos restantes haviam sido classificados erroneamente como positivos para IVL, sendo portanto considerados falso-positivos. Em contrapartida, a análise ao HE falhou em identificar 13 casos de IVL, que foram observados apenas ao estudo IHQ, interpretados como falso-negativos. Deste modo, a análise do coeficiente de Kappa foi considerada apenas moderada ($Kappa=0,50$), menos significativa do que se esperaria com um resultado bastante semelhante em relação ao número de casos detectados.

A avaliação de IVL ao HE está sujeita a esses equívocos por não ser capaz de distinguir artefatos de retração ao redor de glândulas, ou de 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 (Arigami *et al.*, 2005; Sako *et al.*, 2006; Yonemura *et al.*, 2006). 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 seqüenciais 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 (Pantel, Brakenhoff, 2004). 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.

À análise pelo método de rotina, a IVS foi evidenciada em 38 casos, sendo confirmada pela IHQ apenas em 14 casos. Podemos perceber que 24 casos correspondem a falso-positivos para IVS ao HE. Em contrapartida, dos 57 casos considerados negativos ao exame convencional pela HE, 10 falso-negativos foram identificados como IVS à IHQ. Portanto, a detecção de IVS pela IHQ foi significativamente menor que ao HE ($p=0,02$). Esse dado produziu um coeficiente de concordância muito baixo ($Kappa=0,20$), devido à identificação de um grande número de casos como falso-positivos. O resultados falso-positivos obtidos ao HE podem ser atribuídos aos casos de IVL que foram interpretados inadvertidamente como IVS, uma vez que esta coloração não possibilita distinção adequada entre vasos linfáticos e sanguíneos em todos os casos (Van Den Eynden, Van Der Auwera *et al.*, 2006).

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 (An, Baik *et al.*, 2007). É interessante assinalar que, embora esses 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 (Yokota, Ishiyama *et al.*, 2004). 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 (Arigami *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006; Kim, Park *et al.*, 2009).

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 (Zheng, Li *et al.*, 2008). 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 que eram também 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 (Sako *et al.*, 2006).

O risco de metástases linfonodais no CG precoce intramucoso é de apenas 3,2%, atingindo aproximadamente 19,2% quando há invasão da submucosa (Kwee, Kwee, 2008). 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 (An, Baik *et al.*, 2007).

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 (Nakajima, 2002). 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.* propôs 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 (Gotoda *et al.*, 2000). Esse trabalho possibilitou a ampliação do universo de pacientes com CG precoce que potencialmente também poderiam ser elegíveis para ressecção endoscópica do tumor, mesmo com invasão da submucosa.

Os achados da revisão sistemática de 45 trabalhos com metanálise dos resultados, publicada por Kwee e Kwee em 2008, trazem a avaliação de diversas variáveis associadas significativamente com a presença de metástases linfonodais no CG precoce (Kwee, Kwee, 2008). 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 da 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 maioria desses fatores considerados preditivos pode ser perfeitamente avaliável por meio de exames propedêuticos no pré-operatório: endoscopia digestiva acompanhada de biópsia e métodos de imagem, como tomografia computadorizada e ultrassom endoscópico. Entretanto, a presença ou ausência de IVL e IVS só pode ser avaliada pelo estudo anatomopatológico, após a ressecção do tumor. A IVL foi o fator preditivo mais significativo na análise univariada para CG precoce. Porém, o consenso para o tratamento do CG da JGCA não se baseia na presença ou ausência de IVL para a definição terapêutica (Nakajima, 2002), o que constitui, no nosso entendimento, em uma importante falha na avaliação adequada do prognóstico dos pacientes e, por conseguinte, do tratamento.

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

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, podendo ser de grande valor na prática clínica, especialmente nos casos em que não é possível determinar o estadiamento linfonodal, seja por número insuficiente de linfonodos dissecados ou por não realização de linfadenctomia;
- ✓ 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) foi a única característica clínico-patológica correlacionada com a presença de invasão vascular sanguínea;
- ✓ A profundidade de infiltração tumoral além da submucosa (CG avançado), a classificação histológica de Laurén (tipo misto/NC) e a invasão de órgãos por continuidade (esôfago e duodeno) foram as características clínico-patológicas correlacionadas à presença de metástases linfonodais.

PERSPECTIVAS FUTURAS:

Os resultados desta dissertação de mestrado levantaram outras questões a serem respondidas no que diz respeito à vascularização da parede gástrica no CG. Portanto, pretendemos dar seguimento a esta pesquisa em projeto de doutorado, que terá como objetivo estudar a angiogênese e a linfangiogênese em uma série de carcinomas gástricos e correlacioná-las com características patológicas dos tumores e sobrevida dos pacientes.

Para responder às perguntas formuladas, definimos os seguintes objetivos:

- ✓ Avaliar a angiogênese por meio da marcação imuno-histoquímica pelo CD34 dos vasos sanguíneos e pelo CD105 (marcador específico de vasos sanguíneos neoformados);
- ✓ Avaliar a linfangiogênese por meio da marcação dos vasos linfáticos pela imuno-histoquímica com D2-40 e VEGFR-3 (receptor do fator de crescimento C derivado do endotélio vascular);
- ✓ Determinar o valor da densidade microvascular de vasos sanguíneos (DMV) e linfáticos (DVL) para cada um dos marcadores em estudo;
- ✓ Correlacionar a DMV e a DVL com as características anatomopatológicas dos tumores (subtipos histológicos, pT, pN e estadiamento) e com a sobrevida dos pacientes;
- ✓ Analisar comparativamente a DMV e a DVL com a detecção de IVS e IVL pelo método imuno-histoquímico.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L. A. *et al.* *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. Lyon
Oxford: IARC Press ;
Oxford University Press distributor, 2000. (World Health Organization classification of tumours.).
- ALVES, V. A. F. *et al.* *Manual de Imuno-histoquímica*. Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
- AN, J. Y. *et al.* Predictive factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: analysis of a single institutional experience. *Ann Surg*, v. 246, n. 5, p. 749-53, 2007.
- ARIGAMI, T. *et al.* Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer*, v. 93, n. 6, p. 688-93, 2005.
- ARNAOUT-ALKARAIN, A. *et al.* Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol*, v. 20, n. 2, p. 183-91, 2007.
- BLASER, M. *et al.* Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res*, v. 55, n. 3, p. 562-5, 1995.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, v. 3, n. 6, p. 401-10, 2003.
- BORRMANN, R. Geshwulste des magens und duodenums. In: HENKE, F. *et al* (Ed.). *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*. Berlin: Springer-Verlag, p. 865, 1926.
- BRENNER, H. *et al.* Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol*, v. 472, p. 467-77, 2009.
- BUSSOLINO, F. *et al.* Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*, v. 22, n. 7, p. 251-6, 1997.
- CABRAL, M. M. D. A. *et al.* Apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis is related to *cagA* status. *Helicobacter*, v. 11, n. 5, p. 469-76, 2006.
- _____. Gastric epithelial cell proliferation and *cagA* status in *Helicobacter pylori* gastritis at different gastric sites. *Scand J Gastroenterol*, v. 42, n. 5, p. 545-54, 2007.

- CABRAL, M. M. D. A. *et al.* Helicobacter pylori associated gastritis: topographical pattern, associated diseases and correlation with cagA status. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, p. 51-9, 2006.
- CARNEIRO, F. Classification of gastric carcinomas. *Curr Diagn Pathol*, v. 4, n. 1, p. 51-59, 1997.
- CIMERMAN, M. *et al.* Comparison of Laurén's, Ming's and WHO histological classifications of gastric cancer as a prognostic factor for operated patients. *Int Surg*, v. 79, n. 1, p. 27-32, 1994.
- COBURN, N. Lymph nodes and gastric cancer. *J Surg Oncol*, v. 99, n. 4, p. 199-206, 2009.
- COLEMAN, M. *et al.* Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ*, n. 121, p. 1-806, 1993.
- CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*, v. 52, n. 24, p. 6735-40, 1992.
- _____. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*, v. 19 Suppl 1, p. 537-43, 1995.
- CORREA, P. *et al.* A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*, v. 2, n. 7924, p. 58-60, Jul 1975.
- CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*, v. 133, n. 2, p. 659-72, 2007.
- CORREA, P.; PIAZUELO, M. Natural history of Helicobacter pylori infection. *Dig Liver Dis [S.I.]*, v. 40, n. 7, p. 490-6, Jul 2008.
- CORREA, P. *et al.* Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg*, v. 95, n. 4, p. 218-24, 2006.
- COŞKUN, U. *et al.* Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma. *J Surg Res*, 2009.
- DE GARA, C. *et al.* A population-based study of tumor-node relationship, resection margins, and surgeon volume on gastric cancer survival. *Am J Surg*, v. 186, n. 1, p. 23-7, 2003.
- DE VRIES, A. *et al.* The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, v. 12, n. 1, p. 1-15, Feb 2007.
- DEL CASAR, J. *et al.* Lymphatic and/or blood vessel invasion in gastric cancer: relationship with clinicopathological parameters, biological factors and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 134, n. 2, p. 153-61, 2008.

ELPEK, G. *et al.* Microvessel count, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 indices in gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*, v. 6, n. 1, p. 59-64, 2000.

FENOGLIO-PREISER, C. *et al.* Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. *Semin Oncol*, v. 23, n. 3, p. 292-306, Jun 1996.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*, v. 57, p. 1-18, 2006.

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

FORMAN, D.; BURLEY, V. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 20, n. 4, p. 633-49, 2006.

FURUKAWA, H. *et al.* The role of surgery in the current treatment of gastric carcinoma. *Gastric Cancer*, v. 5 Suppl 1, p. 13-6, 2002.

GAO, P. *et al.* Clinicopathological significance of peritumoral lymphatic vessel density in gastric carcinoma. *Cancer Lett*, v. 263, n. 2, p. 223-30, 2008.

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

GOTODA, 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*, v. 3, n. 4, p. 219-25, 2000.

GREENE, F. L. *et al.* *AJCC cancer staging manual*. 6th. ed. New York: Springer-Verlag, 2002.

GUPTA, M. K.; QIN, R. Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*, v. 9, n. 6, p. 1144-55, 2003.

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

HARRIS, E. *et al.* Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol*, v. 32, n. 12, p. 1816-21, 2008.

HOHENBERGER, P.; GRETSCHER, S. Gastric cancer. *Lancet*, v. 362, n. 9380, p. 305-15, 2003.

HYUNG, W. J. *et al.* Application of minimally invasive treatment for early gastric cancer. *J Surg Oncol*, v. 85, n. 4, p. 181-5; discussion 186, 2004.

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

INCA, I. N. D. C.-. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. *bienal*. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009. p. 98.

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

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

JAPANESE GASTRIC CANCER ASSOCIATION. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition -. *Gastric Cancer*, v. 1, n. 1, p. 10-24, 1998.

JENTSCHURA, D. *et al.* Quality-of-life after curative surgery for gastric cancer: a comparison between total gastrectomy and subtotal gastric resection. *Hepatogastroenterology*, v. 44, n. 16, p. 1137-42, 1997.

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

JI, R. C.; KATO, S. Lymphatic network and lymphangiogenesis in the gastric wall. *J Histochem Cytochem*, v. 51, n. 3, p. 331-8, 2003.

JIANG, Q. *et al.* Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, v. 20, n. 4, p. 833-42, 1996.

JOOSSENS, J.; GEBOERS, J. Nutrition and gastric cancer. *Nutr Cancer*, v. 2, n. 4, p. 250-61, 1981.

JOOSSENS, J. *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*, v. 25, n. 3, p. 494-504, 1996.

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

KAMANGAR, F. *et al.* 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*, v. 24, n. 14, p. 2137-50, 2006.

KAMATA, I. *et al.* Significance of lymphatic invasion and cancer invasion-related proteins on lymph node metastasis in gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 24, n. 9, p. 1527-33, 2009.

KATO, S. *et al.* Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anat Sci Int*, v. 81, n. 2, p. 71-83, 2006.

KIM, J. H. *et al.* Clinical Significance of immunohistochemically-identified lymphatic and/or blood vessel tumor invasion in gastric cancer. *J Surg Res*, Epub ahead of print: 2009.

KIM, J. P. *et al.* Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10 783 patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, v. 1, n. 2, p. 125-33, 1998.

KITADAI, Y. *et al.* Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer*, v. 115, n. 3, p. 388-92, 2005.

KODERA, Y. *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*, v. 32, n. 9, p. 2015-20, 2008.

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

LANDIS, J.; KOCH, G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159-74, 1977.

LAURÉN, 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*, v. 64, p. 31-49, 1965.

_____. Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol Suppl*, v. 180, p. 160-4, 1991.

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*, v. 71, n. 10, p. 2926-33, 1993.

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

LEMES, L. A. O. *et al.* Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*, v. 39, n. 1, p. 9, 2003.

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

LIU, C. *et al.* Prognostic role of lymphatic vessel invasion in early gastric cancer: A retrospective study of 188 cases. *Surg Oncol*, v. 19, n. 1, p. 4-10, 2008.

- LUEBKE, T. *et al.* Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. *World J Surg*, v. 29, n. 11, p. 1422-7; discussion 1428, 2005.
- MAEHARA, Y. *et al.* Predictors of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg*, v. 79, n. 3, p. 245-7, 1992.
- MAEHARA, Y. *et al.* Lymphatic invasion and potential for tumor growth and metastasis in patients with gastric cancer. *Surgery*, v. 117, n. 4, p. 380-5, 1995.
- MARKS, A. *et al.* Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*, v. 80, n. 3-4, p. 569-78, 1999.
- MARSHALL, B.; WARREN, J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, v. 1, n. 8390, p. 1311-5, 1984.
- MING, S. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer*, v. 39, n. 6, p. 2475-85, 1977.
- _____. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer*, v. 1, n. 1, p. 31-50, 1998.
- MOHAMMED, R. *et al.* Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. *Am J Surg Pathol*, v. 31, n. 12, p. 1825-33, 2007.
- MOREAUX, J.; BOUGARAN, J. Early gastric cancer. A 25-year surgical experience. *Ann Surg*, v. 217, n. 4, p. 347-55, 1993.
- MORITA, H. *et al.* Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch*, v. 454, n. 2, p. 143-51, 2009.
- MULLANEY, P. *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*, v. 89, n. 11, p. 1405-8, 2002.
- NAKAJIMA, T. Gastric cancer treatment guidelines in Japan. *Gastric Cancer*, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2002.
- NAKAMURA, Y. *et al.* Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol*, v. 59, n. 1, p. 77-82, 2006.
- NASU, J. *et al.* Predictive factors of lymph node metastasis in patients with undifferentiated early gastric cancers. *J Clin Gastroenterol*, v. 40, n. 5, p. 412-5, 2006.

NAUMOV, G. N. *et al.* Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*, v. 5, n. 16, p. 1779-87, 2006.

_____. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst*, v. 98, n. 5, p. 316-25, 2006.

NEUFELD, G.; KESSLER, O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, v. 25, n. 3, p. 373-85, 2006.

NOGUEIRA, A. *et al.* Distal gastric carcinoma with duodenal invasion. Histopathologic study and review of the literature. *Arq Gastroenterol*, v. 37, n. 3, p. 168-73, 2000.

NYBERG, P. *et al.* Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res [S.I.]*, v. 65, n. 10, p. 3967-79, May 15 2005.

ONO, H. Early gastric cancer: diagnosis, pathology, treatment techniques and treatment outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 18, n. 8, p. 863-6, 2006.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, v. 4, n. 6, p. 448-56, 2004.

QUEIROZ, D. *et al.* cagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer*, v. 78, n. 2, p. 135-9, 1998.

RIBATTI, D. *et al.* The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, v. 21, n. 1, p. 44-52, 2007.

ROBERT, M. *et al.* Recommendations for the reporting of gastric carcinoma. *Hum Pathol*, v. 39, n. 1, p. 9-14, 2008.

RODRIGUES, M. A. *et al.* *Diagnóstico, classificação e estadiamento do carcinoma gástrico: correlação clínico-patológica com ênfase na classificação histológica de Laurén. Estudo prospectivo em 90 pacientes operados.* 2000. 226 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Belo Horizonte, MG.

ROMA, A. *et al.* Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol*, v. 19, n. 3, p. 392-8, 2006.

SAKO, A. *et al.* Impact of immunohistochemically identified lymphatic invasion on nodal metastasis in early gastric cancer. *Gastric Cancer*, v. 9, n. 4, p. 295-302, 2006.

SETÄLÄ, L. *et al.* Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *Br J Cancer*, v. 74, n. 5, p. 766-72, 1996.

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

SHIMADA, Y. JGCA (The Japan Gastric Cancer Association). Gastric cancer treatment guidelines. *Jpn J Clin Oncol*, v. 34, n. 1, p. 58, 2004.

SIEWERT, J. *et al.* Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg*, v. 228, n. 4, p. 449-61, 1998.

SOBIN, L. H. *et al.* *TNM classification of malignant tumours*. New York: J. Wiley, 2002.

SON, H. *et al.* Characteristics of submucosal gastric carcinoma with lymph node metastatic disease. *Histopathology* [S.l.], v. 46, n. 2, p. 158-65, Feb 2005.

SONG, S. *et al.* Characteristics of intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastatic disease. *Histopathology*, v. 44, n. 5, p. 437-44, 2004.

TAHARA, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ*, n. 157, p. 327-49, 2004.

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

TAYLOR, D.; BLASER, M. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*, v. 13, p. 42-59, 1991.

TENDERENDA, M. *et al.* Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res*, v. 7, n. 2, p. 129-34, 2001.

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

TONINI, T. *et al.* Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, v. 22, n. 42, p. 6549-56, 2003.

UÑA, E. Gastric cancer: predictors of recurrence when lymph-node dissection is inadequate. *World J Surg Oncol*, v. 7, p. 69, 2009.

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

WARREN, J. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, v. 29, n. 3, p. 705-51, 2000.

WEIDNER, N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol*, v. 31, n. 4, p. 403-5, 2000.

_____. New paradigm for vessel intravasation by tumor cells. *Am J Pathol*, v. 160, n. 6, p. 1937-9, 2002.

_____. The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow. *Am J Clin Pathol*, v. 122, n. 5, p. 675-7, 2004.

WILSON, K.; CRABTREE, J. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*, v. 133, n. 1, p. 288-308, 2007.

YASUDA, K. Early gastric cancer: diagnosis, treatment techniques and outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 18, n. 8, p. 839-45, 2006.

YOKOTA, T. *et al.* Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand J Gastroenterol*, v. 39, n. 4, p. 380-4, 2004.

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

ZHENG, H. C. *et al.* Mixed-type gastric carcinomas exhibit more aggressive features and indicate the histogenesis of carcinomas. *Virchows Arch*, v. 452, n. 5, p. 525-34, 2008.

APÊNDICE 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**".

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

O presente trabalho intitulado “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” faz parte do projeto mais amplo aprovado no parecer acima Protocolo Nº 574/07.

APÊNDICE B – Certificado de apresentação oral do trabalho no XXVII Congresso Brasileiro de Patologia, em 29 de outubro de 2009, Búzios – RJ, promovido pela Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

| | | |
|---|--|---|
|  | <p>XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA 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</p> | | |
| <p>na qualidade de</p> | <p>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> | | |

ANEXO 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 distributor, 2000. (World Health Organization classification of tumours.).

TNM classification of gastric tumours

| TNM classification ¹ | | | | |
|---------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------------|---------------|
| T – Primary Tumour | | M – Distant Metastasis | | |
| 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 | |
| | | Stage Grouping | | |
| T1 | Tumour invades lamina propria or submucosa | Stage 0 | Tis | N0 M0 |
| T2 | Tumour invades muscularis propria or subserosa ² | Stage IA | T1 | N0 M0 |
| T3 | Tumour penetrates serosa (visceral peritoneum) without invasion of adjacent structures ^{2,3,4,5} | Stage IB | T1 | N1 M0 |
| T4 | Tumour invades adjacent structures ^{2,3,4,5} | | T2 | N0 M0 |
| N – Regional Lymph Nodes | | 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 |

¹{1, 66}. This classification applies only to carcinomas.

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

³ 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.

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

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

ANEXO 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 _____ | (<i>outro órgão</i>) |
| Exame macroscópico | | | |
| Peça cirúrgica | | | |
| 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 | |
| Épíplon: <input type="checkbox"/> ausente <input type="checkbox"/> presente _____ cm; | <input type="checkbox"/> não comprometido | <input type="checkbox"/> comprometido _____ cm | |
| Tumor | | | |
| 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 | | |
| Aspecto macroscópico (classificação): | | | |
| 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) | | | |
| Infiltração da parede gástrica até a: | | | |
| <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: _____ | | | |
| _____ | | | |
| Exame microscópico | | | |
| Classificação histológica da neoplasia | | | |
| 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 | | | |

ANEXO 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:

