Eneida Ribeiro Marinho

Avaliação imunohistoquímica da densidade microvascular em adenocarcinoma gástrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo

São Paulo
2003

Eneida Ribeiro Marinho

Avaliação imunohistoquímica da densidade microvascular em adenocarcinoma gástrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marinho, Eneida Ribeiro
Avaliação imuno-histoquímica da densidade microvascular em adenocarcinoma gástrico / Eneida Ribeiro Marinho. -- São Paulo, 2003.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Gastroenterologia.
Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.
Orientador: Ulysses Ribeiro Júnior.

Descritores: 1.NEOPLASIAS GÁSTRICAS/cirurgia 2.NEOPLASIAS GÁSTRICAS/irrigação sangüínea 3.ADENOCARCINOMA/cirurgia 4.NEOVASCULARIZAÇÃO PATOLÓGICA/cirurgia 5.IMUNOHISTOQUÍMICA/métodos 6.ANTÍGENOS CD34 7.ANTÍGENOS CD31 8.ESTADIAMENTO 9.ESTUDOS RETROSPECTIVOS

USP/FM/SBD-391/03

Aos meus pais, Alcides e Juracema, exemplos maiores em minha vida. E aos meus filhos André Luiz e Luiz Fernando razões de minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Ulysses Ribeiro Júnior**, orientador desta dissertação. Obrigada pelo apoio, dedicação, amizade e pela oportunidade de ampliar os meus horizontes no âmbito científico e acadêmico.

Aos Professores **Bruno Zilberstein** e **Joaquim Gama-Rodrigues** pelo empenho e dedicação na concretização deste pioneiro programa de pós-graduação interinstitucional.

Aos Doutores **Maurício Brasil Leite** e **Maria Auxiliadora de Paula Carneiro Cysneiros**, patologistas do Serviço de Imunomorfologia e Morfologia Molecular do HC-FMUFG. Pela dedicação na realização dos testes histopatológicos e imunohistoquímicos deste estudo.

A **Vanessa de Paula Rocha** e **Flaviane Ribeiro dos Santos**, bioquímicas do laboratório de imunohistoquímica do Hospital das Clínicas da UFG, pela presteza e seriedade com que confeccionaram os exames histológicos e imunohistoquímicos deste trabalho.

Ao Doutor **Manoel Maria**, mestre e incentivador inquestionável. Obrigada pela confiança e referência de nosso nome.

Ao Doutor **Leosarte Alves**, pelo empenho diário na realização deste programa de pós-graduação.

À Doutora **Fátima Murhue**, pelo valioso apoio dado nos primeiros passos deste trabalho.

Ao Doutor **Orlando Milhomem da Mota**, chefe do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital Araújo Jorge, pela gentileza de sua concessão, nos permitindo o acesso aos casos do serviço.

Ao Doutor **Osterno Queiroz da Silva**, pela competência e experiência com que norteou o princípio deste trabalho.

Ao Doutor **Élbio Cândido de Paula**, chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, pelo gentil acesso aos blocos de parafina, material indispensável na realização deste trabalho.

À **Marilene Alves Rocha**, pela dedicação e presteza na separação dos blocos de parafina.

Ao Doutor **Luiz Queiroz da Silva**, colega, amigo, irmão. Pelo constante estímulo e incentivo. Por ter, com sua genialidade espirituosa, tornado mais amenos os primeiros árduos passos de minha vida profissional e da realização deste trabalho. Minha eterna gratidão.

Gostaria de agradecer a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que não tenham sido aqui citados.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1.0 Revisão bibliográfica 1

1.1 Angiogênese – conceito e importância nos fenômenos biológicos.... 2

1.2 Importância clínica da angiogênese 8

1.3 Quantificação da angiogênese tumoral 11

2.0 Objetivos 13

3.0 Casuística e Métodos 15

3.1 Casuística 16

3.1.1 Critérios de inclusão 17

3.1.2 Critérios de exclusão 17

3.2 Métodos 18

3.2.1 Avaliação clínica 18

3.2.2 Aspectos cirúrgicos 18

3.2.3 Avaliação histológica 19

3.2.4 Avaliação Imunohistoquímica 20

4.0 Resultados 27

5.0 Discussão 42

6.0 Conclusões 58

7.0 Anexo 60

8.0 Referências Bibliográficas 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DP	desvio padrão
ed.	edição
et al.	e outros
M	metástase
mm	milímetro (s)
mm^3	milímetro (s) cúbico (s)
µm	micrômetro (s)
p.	página
PBS	solução salina tamponada com fosfato
pN	estadiamento patológico dos linfonodos
pT	estadiamento patológico do tumor
pTNM	estadiamento patológico do TNM
rev.	revista
v.	volume
VEGF	vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos anticorpos utilizados nas imunorreações 22

Tabela 2 - Características da amostra 29

Tabela 3 - Densidade microvascular tumoral 31

Tabela 4 - Correlação entre os fatores patológicos e a contagem de microvasos 33

Tabela 5 - Correlação entre fatores patológicos e a intensidade de vascularização com CD31 36

Tabela 6 - Correlação entre fatores patológicos e a intensidade de vascularização com CD34 37

Tabela 7 - Distribuição do VEGF quanto a sua coloração 38

Tabela 8 - Classificação do VEGF segundo o padrão de distribuição dos vasos 39

Tabela 9 - Correlação entre os fatores patológicos e a imunoexpressão do VEGF 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de Laurén 19

Figura 2 - Distribuição por intensidade de vascularização 24

Figura 3 - Diferença na imunocoloração dos anticorpos monoclonais 32

Figura 4 - Distribuição VEGF de acordo com a intensidade de coloração 39

Figura 5 - Classificação do VEGF de acordo com a distribuição da coloração 40

MARINHO, E.R. **Avaliação imunohistoquímica da densidade microvascular em adenocarcinoma gástrico.** São Paulo, 2003, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

O crescimento e a progressão tumorais estão associados à indução da angiogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar a imunoexpressão do VEGF e a densidade de microvasos em adenocarcinomas gástricos. Espécimes cirúrgicos de 89 pacientes submetidos à ressecção gástrica com dissecção linfonodal a D2 foram analisados quanto à densidade microvascular tumoral. Testes imunohistoquímicos foram realizados utilizando-se os anticorpos CD31, CD34, Fator VIII e VEGF através do método da streptavidina-biotina. Os vasos foram contados nas áreas de maior vascularização tumoral e o VEGF foi graduado de 0 a 3, de acordo com a intensidade da imunocoloração. Os resultados imunohistoquímicos foram comparados com os dados patológicos e de extensão loco-regional da doença. Sessenta pacientes (67,4%) eram do sexo masculino e a média de idade foi 59,9 (±13,8) anos. Os tumores foram classificados em tipo intestinal em 62 casos (69,7%) e em difuso em 27 (30%). Onze pacientes (12,4%) apresentaram tumores precoces. A densidade microvascular apresentou média de 67,8 (±31,5) para o anticorpo CD31 e 94,2 (±39,0) para o CD34. A média do número de vasos corados pelo Fator VIII foi 9,2 (±8,2). Houve uma correlação entre os resultados imunohistoquímicos para CD31 e CD34, com r=0,57 e p=0,01. Segundo o VEGF os tumores foram: grau 0 = 16 (18%), I = 48 (53,9%), II = 16 (18%) e III = 9 (10,1%). Não houve associação entre a DMV e os dados patológicos: tipo histológico, grau de diferenciação, tamanho do tumor, invasão da parede gástrica, metástases linfonodais e metástase à distância. A imunoexpressão do VEGF foi associada com alta DMV (p=0,03) e com o estádio tumoral – TNM (p=0,003). Os resultados deste estudo permitiram concluir que a coloração imunohistoquímica com o Fator VIII não é segura como um

marcador de células endoteliais; que os anticorpos CD31 e CD34 foram úteis na avaliação da DMV; e que a imunoexpressão do VEGF pode identificar um comportamento biológico mais agressivo.

MARINHO, E.R. **Immunohistochemistry avaliation of microvascular density in gastric adenocarcinoma**. São Paulo, 2003, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Tumor growth and progression, particularly in aggressive and malignant tumors, are associated with the induction of angiogenesis. The aim of this study was to evaluate the role of VEGF immunoexpression and microvascular density in gastric adenocarcinomas. Specimens from eighty-nine patients who underwent gastric resection with DII lymph node dissection were analyzed regarding microvascular density of the tumors. Immunohistochemistry for CD31, CD34, Factor VIII and VEGF were performed using the streptavidin-biotin-method. The vessels were counted in a hot spot area of the tumors and VEGF was categorized as grade 0 to III, according to the intensity. Immunohistochemical results were compared to pathological data and loco-regional extension of the disease. In the results of 89 patients, sixty (67.4%) were men, and the mean age was 59.9 ± 13.8 years. The tumors were classified as intestinal type in 62 (69.7%) and diffuse in 27 (30.3%). Eleven (12.4%) were early gastric tumors. Microvascular density showed a mean of 67.8 (± 31.5) for CD31 and 94.2 (± 39) for CD34 vessels. The mean number of vessels revealed by the antibody Fator VIII was 9.2 (± 8.2). There was a correlation between immunohistochemistry for CD31 and CD34, $r = 0.57$, $p < 0.01$. The tumors were classified for VEGF as: grade 0 = 16 (18%); I = 48 (53,9%); II = 16 (18%) and III = 9 (10,1%). There was no association between immunohistochemistry and pathological data including: histologic type, grade of differentiation, tumor size, tumor depth, lymph node metastasis and distant metastasis. However, VEGF immunoexpression was associated with high microvascular density ($p = 0,03$) and there was an association between the immunoexpression of VEGF and the tumor stage - TNM ($p = 0,003$). It was concluded that immunohistochemical staining for anti-Factor VIII was not reliable as a microvascular density marker; CD31 and CD34 were useful to demonstrate microvascular density and VEGF

immunoexpression may identify tumors with more aggressive biological behavior.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.0 Revisão bibliográfica

1.1. Angiogênese – conceito e importância nos fenômenos biológicos

O câncer é uma doença na qual as células têm a capacidade de proliferar, expandir localmente e se disseminar, formando focos de crescimento em sítios distantes. Reveste-se de grande importância o conhecimento dos fatores que influenciam estes processos e, dentre estes fatores, destaca-se a angiogênese.

A angiogênese consiste em um processo seqüencial iniciado nas células endoteliais, as quais proliferam, migram e penetram nos tecidos do hospedeiro; e a sua magnitude será determinada pelo balanço entre fatores estimuladores e fatores inibidores (AUERBACH; AUERBACH, 1994; FOLKMAN, 1995).

A angiogênese pode ser quantificada pela avaliação imunohistoquímica da densidade de microvasos, através da identificação de proteínas expressas na superfície das células endoteliais marcadas por anticorpos monoclonais (FRANK et al., 1995). Os anticorpos monoclonais CD31, CD34 e fator VIII podem ser utilizados para a marcação imunohistoquímica da densidade microvascular (ALVES; BACCHI; VASSALLO, 1999).

Um caminho indireto para mensuração da atividade angiogênica em neoplasias é a avaliação da expressão de fatores angiogênicos no tecido

tumoral ou a quantificação de proteínas angiogênicas secretadas nos fluidos corpóreos (POON; FAN; WONG, 2001). O VEGF parece ser o fator angiogênico mais estreitamente associado com a formação de novos vasos nos tumores gástricos (MAEDA et al., 1996). A pesquisa do VEGF, nos tecidos tumorais, é também realizada através de testes imunohistoquímicos, utilizando-se anticorpos policlonais.

A angiogênese tem se mostrado condição indispensável tanto para o crescimento tumoral quanto para a formação de metástases. Sem o fenômeno da neovascularização um tumor seria incapaz de atingir mais de 2 a 3 mm (FOLKMAN et al., 1989). A angiogênese contribui para o aumento tumoral não só pelo aumento da perfusão, mas também, pela produção de fatores de crescimento liberados por células endoteliais (HAMADA et al., 1992).

Alguns autores têm demonstrado que o grau de angiogênese relaciona-se mais às taxas de recorrência e sobrevida do que os marcadores de agressividade tumoral comumente utilizados, tais como tamanho do tumor e grau histológico (HORAK et al., 1992; WEIDNER et al., 1991).

O conhecimento da agressividade dos tumores é de grande importância na decisão terapêutica a ser instituída. A avaliação da angiogênese tem se mostrado como fator prognóstico significante e independente para vários tumores (WEIDNER; FOLKMAN, 1996), entre eles os do cólon (TAKEBAYASHI et al., 1996), do estômago (MAEDA et al., 1996) e de mama (GASPARINI et al.,1994).

Entretanto, os resultados da avaliação da densidade microvascular nos tumores gástricos, publicados na literatura, são controversos, pairando dúvidas quanto ao papel da angiogênese na transformação, progressão e disseminação das células tumorais.

Angiogênese é o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vascularização pré-existente (FOLKMAN, 1971). O conhecimento do fenômeno angiogênico não é fato recente. Existem relatos como o do patologista HERTIG que descreveu, em 1935, a formação de novos vasos sanguíneos em placentas de macacas grávidas (HERTIG,1935). Mas foi somente a partir da década de 60 que se intensificou o estudo sobre o fenômeno angiogênico, tendo como marco a publicação de JUDAH FOLKMAN, em 1971. Este autor postulou que o crescimento tumoral era dependente da angiogênese e este conceito, que foi considerado na época uma verdadeira heresia, é hoje alvo de pesquisas constantes. O bloqueio ou manipulação da capacidade angiogênica vem se solidificando como potencial arma no tratamento de diversas doenças e também do câncer.

A angiogênese é um processo complexo que envolve múltiplas etapas: vasodilatação, permeabilidade endotelial, ruptura da conexão das células endoteliais, proliferação e migração das células endoteliais, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais para formar as estruturas dos microvasos e subseqüente remodelamento formando condutos para passagem dos nutrientes. As diversas substâncias que participam deste processo ainda estão sendo identificadas e não se conhece por completo como elas interagem (WENG, 2000).

A angiogênese está presente em condições fisiológicas e patológicas, tanto benignas quanto malignas. A produção de novos vasos é essencial na reprodução, no desenvolvimento e reparo de feridas; é um processo autolimitado e regulado, ou seja, acionado por breves períodos (dias) e, posteriormente, completamente inibido. Entretanto, muitas doenças demonstram processo persistente de formação de novos vasos. Na artrite, novos vasos sanguíneos invadem a articulação e destroem a cartilagem. No diabetes, novos capilares formados na retina invadem o vítreo, sangram e podem causar cegueira (FOLKMAN, 1987). A neovascularização ocular é a causa mais comum de amaurose e ocorre em aproximadamente 20 doenças oculares (FOLKMAN, 1992)

Os vasos sanguíneos capilares consistem em células endoteliais e pericitos. Estes dois tipos de células promovem a formação dos tubos, ramificações e de toda a rede capilar. Existem moléculas específicas, tanto para estimular, quanto para inibir este processo; e são estas moléculas com funções opostas que agem continuamente mantendo a microvasculatura quiescente, onde as células endoteliais se renovam em centenas de dias. Entretanto, as mesmas células endoteliais podem iniciar rápida proliferação (renovação em 5 dias), como ocorre, por exemplo, na cicatrização de feridas (FOLKMAN; SHING, 1992).

Durante a angiogênese, as células endoteliais emergem de seu estado de latência e podem proliferar tão rapidamente quanto as células da medula óssea. Porém, é uma atividade focal e de curta duração, sendo observada nos folículos ovarianos ou em tecidos em fase de cicatrização. A

angiogênese patológica também pode ser um processo focal; todavia persiste por meses ou anos (FOLKMAN, 1997).

O crescimento dos tumores sólidos é sempre acompanhado por neovascularização. E este crescimento vascular é mais vigoroso e contínuo que o crescimento de brotos capilares observados em feridas recentes ou na inflamação (ALGIRE et al., 1945).

A população de células tumorais e de células endoteliais capilares, dentro da neoplasia, constituem um ecossistema altamente integrado. Neste ecossistema o índice mitótico das populações celulares é interdependente. As células tumorais estimulam a proliferação das células endoteliais – e as células endoteliais têm efeito indireto na taxa de crescimento tumoral (FOLKMAN, 1971).

Na neoplasia, cada aumento na população de células tumorais deve ser precedido por um aumento de novos vasos capilares, os quais convergem sobre o tumor. As células tumorais são circundadas por vasos sanguíneos capilares disposto em configuração cilíndrica com raio de 150 a 200 μm, equivalente à distância de difusão do oxigênio. A síntese de DNA diminui com o aumento da distância das células tumorais do capilar mais próximo, limitando o crescimento tumoral (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987). Para um tumor crescer além do limite de 1–2 mm^3 as células tumorais devem não apenas proliferar; devem também estar aptas a induzir o crescimento de novos vasos sanguíneos capilares do hospedeiro (FOLKMAN, 1995).

Quando ocorre completa ausência de vascularização, tumores humanos e tumores animais espontâneos ficam restritos a pequenas dimensões, como os carcinomas *in situ* microscópicos e micrometástases. Por outro lado, a ausência ou bloqueio da angiogênese não necessariamente previne a proliferação das células tumorais. Alta taxa de proliferação celular tumoral ocorre, mas pode ser balanceada com alta taxa de apoptose, não havendo, portanto, expansão da massa tumoral (FOLKMAN, 1997).

A angiogênese não é só essencial para o crescimento tumoral; também implicada em progressão inicial de lesão pré-maligna ao câncer (HANAHAN; FOLKMAN, 1996), invasão de células neoplásicas na circulação (LIOTTA; STRACKE, 1998) e progressão de micrometástases dormentes em lesões clinicamente detectáveis (HOLMGREN; O'REILLY; FOLKMAN, 1995).

A atividade angiogênica pode ocorrer durante a progressão multi-estágio da neoplasia, podendo ocorrer antes ou após o início da neoplasia. No câncer do colo uterino a atividade angiogênica aparece no estágio pré-neoplásico; mas em outros tumores, como o melanoma, o carcinoma mamário e de próstata, o fenômeno ocorre após a transformação neoplásica (FOLKMAN, 1997). No carcinoma mamário as células endoteliais podem proliferar, em média, 45 vezes mais rápido do que as células endoteliais do estroma benigno adjacente (VARTANIAN; WEIDNER, 1994).

O tumor pode, continuamente, estimular a formação de novos vasos capilares para promover seu próprio crescimento. Posteriormente, os vasos neoformados embebidos no tumor promovem canais, onde as células

tumorais penetram na corrente sanguínea e originam metástases para sítios distantes – fígado, pulmões e ossos (FOLKMAN, 1992).

1.2. Importância clínica da angiogênese

FOLKMAN revisou as aplicações clínicas da angiogênese, as quais tem seguido duas direções no paciente com câncer: a quantificação da angiogênese para uso no diagnóstico e prognóstico; e a inibição da angiogênese para impedir ou diminuir o crescimento tumoral (FOLKMAN, 1995).

A angiogênese está envolvida desde a fase mais precoce de formação do câncer até o estágio final de metástase á distância. O crescimento e a disseminação metastática dos tumores sólidos requerem suporte vascular para suprimento de nutrientes e acesso das células à circulação (FOLKMAN, 1990).

Em 1991, WEIDNER publicou seu primeiro estudo mostrando a influência prognóstica da neovascularização tumoral no carcinoma mamário. As propriedades angiogênicas se correlacionaram com a agressividade tumoral (WEIDNER et al., 1992) – e com a capacidade dos tumores malignos em se expandir localmente a dar metástases à distância (VERMEULEN et al., 1996).

A densidade microvascular intratumoral (avaliada pela coloração imunohistoquímica através de marcadores celulares específicos para células endoteliais) demonstrou ser um fator prognóstico independente em

diferentes tumores sólidos (WEIDNER, 1995), dentre eles, os cânceres de mama (HEIMANN et at., 1996), cólon (TAKAHASHI et al., 1997) e carcinoma gástrico (MAEDA et al., 1995). Estudos mais recentes têm demonstrado associação entre densidade microvascular e resultados clínicos, também em casos de linfomas (VACCA et al., 1999) e leucemias (PADRO et al., 2000).

A contagem dos microvasos e a identificação dos fatores angiogênicos como o VEGF, demonstraram ser fatores prognósticos independentes (TANIGAWA et al., 1997).

O VEGF (vascular endothelial growth factor) é uma molécula mediadora solúvel, composta por um dímero protéico, com potencial mitogênico para células endotelias vasculares isoladas de pequenos e grandes vasos (LEUNG et al.,1989). O fator angiogênico VEGF é um dos mais bem estudados fatores de crescimento e é encontrado na maioria dos diferentes tipos de tumores humanos. Durante o desencadeamento do processo angiogênico, um ou mais fatores estimuladores podem ser super-expressos (KANDEL et al.,1991), mobilizados da matrix extracelular (FOLKMAN et al., 1988) ou liberados por macrófagos recrutados pelo tumor (POLVERINI; LEIBOVICH, 1984). Os fatores angiogênicos podem estar sob o controle de oncogenes específicos (RAK et al., 1995).

Segundo KAKEJI, et al. a detecção imunohistoquímica do VEGF pode ser um fator prognóstico em tumores gástricos precoces e avançados. A hiper-expressão do VEGF e do p53 estão associadas com angiogênese intratumoral e metástases para órgãos distantes. A angiogênese no câncer gástrico é estreitamente relacionada com o potencial de invasão vascular e

metástases. O alto grau de vascularização tumoral aumenta a probabilidade das células tumorais entrarem na circulação sistêmica e formarem metástases (KAKEJI et al., 2002).

A quantificação da angiogênese parece ser indicador prognóstico mais sensível que os parâmetros patológicos convencionais (POON; FAN; WONG, 2001). Diversos autores afirmam que a angiogênese está relacionada com predição prognóstica em casos de câncer de mama (HEIMANN et al., 1996) e cólon (TAKAHASHI et al., 1997) com linfonodos negativos.

A neovascularização é mais pronunciada nos tumores VEGF positivos, o que sugere estar o suprimento vascular diretamente relacionado ao estímulo deste fator de crescimento. Nos tumores com maior número de vasos induzidos pelo VEGF, o processo metastático pode ser possível devido aos canais dos vasos neoformados, facilitando a invasão vascular. Segundo MAEDA et al. os pacientes com tumores VEGF positivos têm pior prognóstico que aqueles com VEGF negativo. A presença do VEGF pode ser um efetivo preditor de recorrência, principalmente hepática, em pacientes com câncer gástrico, o que auxilia na identificação dos casos que necessitam de terapia pós-operatória (MAEDA et al., 1996).

Dentre os fatores angiogênicos, o VEGF é um dos mais comumente associados com agressividade de doença. A expressão do VEGF está associada com a progressão e prognóstico do carcinoma gástrico, assim, a inibição da atividade do sistema ligando-receptor VEGF,

no câncer gástrico, pode ser uma forma de inibir o crescimento tumoral (JUNG et al., 2002).

MAEDA et al. demonstraram que a contagem de microvasos acompanhou o aumento do estádio dos carcinomas gástricos; e foi significantemente maior à presença de moléstia linfonodal (MAEDA et al., 1995).

A neovascularização é mais pronunciada em estádios avançados, o que sugere que o suprimento vascular reflete aumento do potencial maligno: é o que concluem os autores após correlacionar a densidade de microvasos e a presença de metástases em carcinoma invasor mamário. Os autores demonstraram ainda que a sobrevida global e a sobrevida livre de recidiva se mostrou reduzida nos casos com maior contagem de microvasos (WEIDNER et al., 1992).

1.3. Quantificação da angiogênese tumoral

A avaliação da angiogênese é considerada como um dos fatores prognósticos promissores. Entretanto, os resultados obtidos em diferentes séries têm sido controversos, muito provavelmente pelas dificuldades de reprodutibilidade na quantificação dos vasos neoformados. Três anticorpos têm sido mais comumente utilizados para identificação dos microvasos a serem quantificados: Fator VIII, CD31 e CD34. O Fator VIII foi utilizado nos trabalhos iniciais, como relataram WEIDNER et al. em 1991. Posteriormente,

este anticorpo foi considerado menos efetivo que o CD31 e o CD34 para identificação de vasos (ALVES; BACCHI; VASSALLO, 1999).

Vários estudos analisaram a DMV utilizando o anticorpo Fator VIII para imunocorar os microvasos. Esta técnica tem demonstrado ser segura, mas a variabilidade de coloração e perda da reprodutibilidade pode produzir resultados ambíguos (TANIGAWA et al., 1996).

Alguns trabalhos têm considerado o CD31 como marcador mais sensível para células endoteliais do que o antígeno Fator VIII (HORAK et al.,1992; TOI; KASHITANI; TOMINAGA, 1993).

ANTHONY e RAMANI demonstraram que o anticorpo monoclonal contra CD34 demonstrou corar vasos sanguíneos, tanto do tecido normal quanto do maligno (ANTHONY et al., 1991). Segundo HOLLINGSWORTH et al., o anticorpo anti-CD34 apresentou coloração consistente e reprodutível e não exibiu os problemas inerentes ao Fator VIII (HOLLINGSWORTH et al., 1995).

No estudo de GRAHAM (GRAHAM et al., 1994) observou-se que o anticorpo anti-CD34 foi mais sensível e mais específico que o anticorpo anti-Fator VIII na coloração de células endoteliais. O primeiro não reage com células epiteliais ou estromais. Baseado em trabalhos como este é que se acredita poder a imunocoloração dos microvasos com anti-CD34 promover uma mensuração mais acurada da angiogênese tumoral no estudo do carcinoma gástrico (TANIGAWA et al., 1996).

OBJETIVOS

2.0 Objetivos

Os objetivos deste estudo, perante a análise tecidual de adenocarcinoma gástrico, incluem a avaliação da:

- Densidade microvascular através da imunoexpressão dos anticorpos monoclonais CD31, CD34 e Fator VIII
- Correlação entre os diversos marcadores de densidade microvascular
- Imunoexpressão do fator angiogênico VEGF no adenocarcinoma gástrico
- Associação entre a imunoexpressão dos referidos marcadores e os dados patológicos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.0 Casuística e métodos

3.1. Casuística

Estudaram-se 89 pacientes com adenocarcinoma gástrico tratados no Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital Araújo Jorge (Goiânia-Goiás), no período de 1997 a 2001. Sessenta pacientes eram (67,4%) do sexo masculino e 29 (32,6%) do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi de 59,9 (± 13,8) anos, com variação de 27 a 89 anos.

Avaliaram-se, com base nos prontuários, dados clínicos incluindo sexo e idade e dados relacionados à extensão locorregional da doença e estádio TNM (UICC/AJCC,1997). Através do laudo macroscópico e microscópico da peça cirúrgica, foram obtidas as informações relacionadas às características do tumor primário: a localização do tumor; o diâmetro máximo da lesão tumoral; a extensão da invasão tumoral na espessura da parede gástrica (pT); e as características da doença linfonodal regional (envolvimento tumoral no total de linfonodos dissecados – pN). Baseando-se na descrição cirúrgica (com dados do inventário da cavidade abdominal) e nos exames radiológicos complementares foram obtidas informações a respeito da extensão da doença tumoral metastática (M).

Foram selecionados os blocos de parafina dos 89 casos da amostra para avaliação, tanto das características histológicas quanto imunohistoquímicas.

3.1.1. Critérios de inclusão

Admitiram-se os seguintes critérios de inclusão:

- Casos de adenocarcinoma gástrico, precoce ou avançado, submetidos à gastrectomia total ou parcial
- Casos cujos prontuários continham os dados clínico-patológicos exigidos pela metodologia e material suficiente e/ou adequado para o estudo histopatológico e imunohistoquímico
- Casos tratados com intervalo máximo de cinco anos, visando melhor conservação dos blocos de parafina

3.1.2. Critérios de exclusão

Todos os casos foram submetidos aos seguintes critérios de exclusão:

- Casos de adenocarcinoma submetidos a tratamento cirúrgico em outros serviços
- Casos submetidos a qualquer tipo de tratamento prévio à admissão, tais como quimioterapia, imunoterapia ou radioterapia
- Casos com outra neoplasia maligna primária, mesmo se já tratada

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação Clínica

Os 89 casos de adenocarcinoma gástrico tiveram seus prontuários revisados, considerando-se os dados clínicos de sexo e idade e as características endoscópicas do tumor como morfologia, dimensões e localização. Os dados fornecidos pelo exame endoscópico foram considerados quando a descrição macroscópica da peça operatória não continha as características do tumor necessárias para análise.

Os exames complementares (radiografia de tórax, ultra-sonografia e tomografia computadorizada) foram avaliados em busca de doença metastática à distância.

3.2.2. Aspectos cirúrgicos

Coletaram-se informações pertinentes à descrição cirúrgica, quanto à técnica de ressecção empregada e quanto à presença de doença na cavidade peritoneal fora dos limites gástricos. Os 89 casos estudados foram submetidos à abordagem cirúrgica com ressecção gástrica total ou parcial com dissecção linfonodal a D2. Incluíram-se no estudo os casos de adenocarcinoma gástrico, tanto precoce quanto avançados.

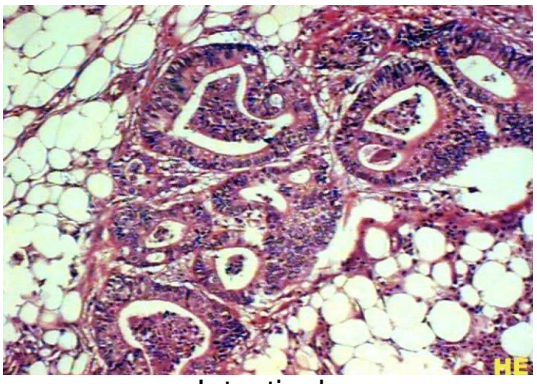
3.2.3 Avaliação histológica

O laudo histopatológico da peça operatória forneceu os seguintes dados: diâmetro tumoral, localização do tumor, grau de diferenciação histológica, infiltração tumoral da parede gástrica (pT) e avaliação linfonodal (pN).

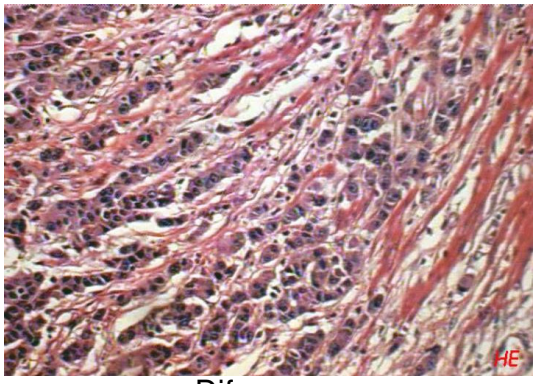
A partir dos blocos de parafina foram feitos novos cortes histológicos, sendo corados pelo método da hematoxilina e eosina. Utilizaram-se estes cortes histológicos para reavaliação das características histopatológicas do tumor e para análise da qualidade do material que seguiria para o estudo imunohistoquímico.

Padronizou-se a análise do tipo histológico adotando-se a classificação de Laurén (LAURÉN,1965), que divide os tumores em tipo intestinal e em tipo difuso.

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO DE LAURÉN



Intestinal



Difuso

3.2.4. Avaliação Imunohistoquímica

Após constatação da qualidade dos blocos de parafina, novos cortes foram realizados para o estudo das características angiogênicas dos tumores. Através da imunocoloração procedeu-se a contagem dos microvasos intratumorais sob a luz da microscopia ótica. A análise imunohistoquímica foi realizada com a identificação dos antígenos relacionados aos anticorpos monoclonais CD31, CD34 e Fator VIII, os quais coram as células endoteliais. Foram utilizados os clones F8/86, QBEnd 10 e 1A10 respectivamente. Além da contagem dos microvasos, fez-se a identificação do fator angiogênico VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) utilizando-se anticorpo policlonal de clone sc-152. O anticorpo VEGF cora o citoplasma das células tumorais reativas para o fator de crescimento (Tabela 1).

Técnica Imunohistoquímica

Empregou-se na imunocoloração foi o método do complexo de streptavidina-biotina-peroxidase. A técnica imunohistoquímica tem por base experiências descritas anteriormente (HSU et al., 1981; RIBEIRO Jr et al., 1998; SAFATLE-RIBEIRO et al., 1996).

Os cortes histológicos confeccionados com espessura de 3 µm foram submetidos a desparafinização através do uso do xilol aquecido, seguido de hidratação com etanol. O material seguiu para o processo de

bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos de 15 minutos cada com peróxido. O peróxido foi lavado em água corrente e, posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão com pH 7,0 (PBS- solução salina tamponada com fosfato). As lâminas foram, então, submetidas ao processo de recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0), em panela de pressão, por 5 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Após mais 5 minutos em solução PBS, cada lâmina foi delimitada com giz de cera, seguida do uso do anticorpo primário específico (CD31, CD34, Fator VIII e VEGF). As lâminas foram, então, para a câmera úmida, onde permaneceram por ± 16 horas (*over night*). Nova lavagem com PBS foi realizada antes da aplicação do anticorpo secundário – kit do LSAB +, Peroxidase - Universal (Laboratório Dako, K0690, EUA). Passados 30 minutos ao abrigo da luz, as lâminas foram lavadas com PBS em abundância, sendo então utilizada a peroxidase biotinalada (StreptABC – Streptavidina Biotina Complexo). A reação findou após uso do cromógeno representado pela diaminobenzidina, seguida pela substância de contra-coloração que é a hematoxilina. Foram feitos banhos em álcool e xilol para desidratação.

Utilizou-se, nas reações, os anticorpos monoclonais nas titulações de 1/400, 1/500, 1/400 e 1/1000 para o CD31, CD34, Fator-VIII e VEGF, respectivamente.

Controles positivos e negativos foram processados (junto com o material a ser pesquisado) para assegurar resultados confiáveis na técnica imunohistoquímica. O controle positivo corresponde a um tecido selecionado

com o propósito de se obter uma reação positiva definida; e este tecido utilizado deve conter grandes quantidades do antígeno em estudo. O controle negativo, ao contrário, corresponde a um tecido que, sabidamente, não contém o antígeno pesquisado. A presença ou ausência de antígeno é presumida baseando-se no conhecimento da microanatomia, fisiologia e biologia do tecido em estudo (controle biológico). Um outro tipo de controle negativo é a utilização de cortes do próprio tecido (em estudo), ao qual se deixa de adicionar o anticorpo primário. Neste estudo utilizaram-se cortes de intestino delgado para controle positivo; e cortes de tecido gástrico (de casos do próprio estudo) sem a adição do anticorpo primário para controle negativo.

TABELA 1 - RELAÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NAS IMUNORREAÇÕES

ANTICORPO	CLONE	LABORATÓRIO	ORIGEM
CD31	1A10	Novocastra	Reino Unido
CD34	QBEnd10	Dako	Dinamarca
Fator VIII	F8/86	Dako	Dinamarca
VEGF	sc-152	Santa Cruz	Estados Unidos

Contagem Vascular

Os cortes histológicos foram rastreados, inicialmente, com magnificação de 100X (10X objetiva + 10X ocular), determinando-se as áreas de maior concentração de microvasos, ou seja, áreas com maior

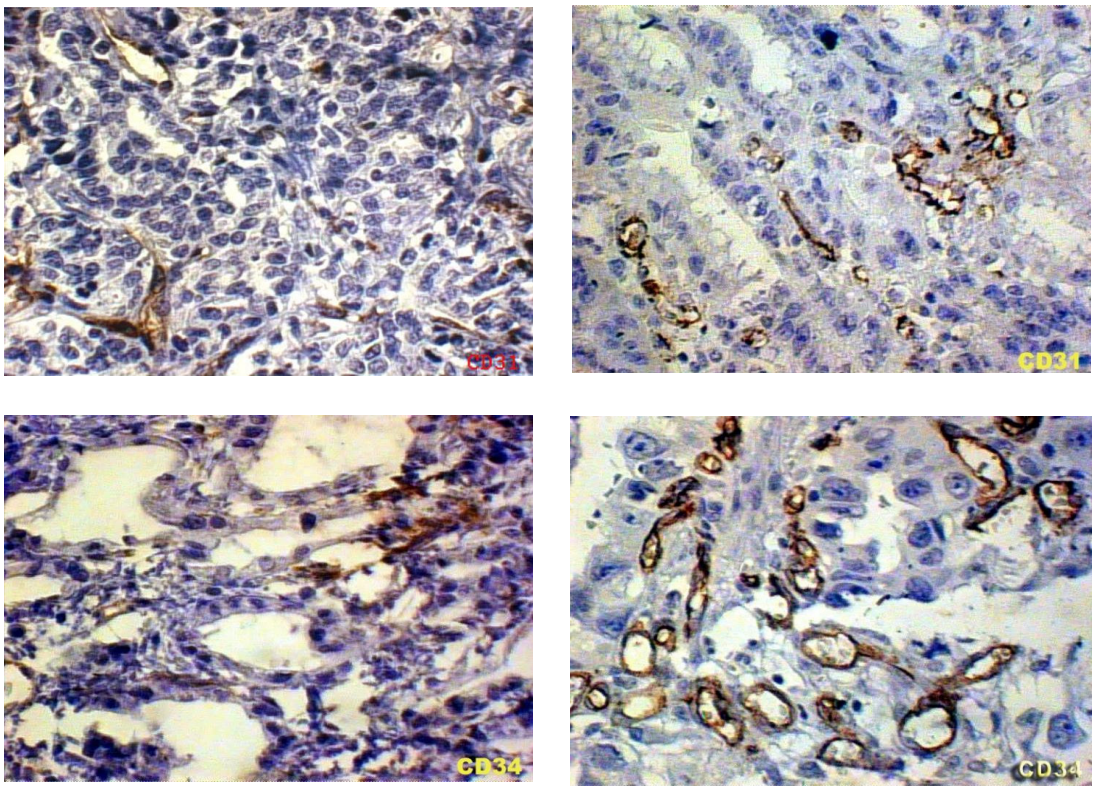
número de capilares e pequenas vênulas. Estas áreas de maior vascularização podem ocorrer no interior do tumor, mas foram mais freqüentes nas margens do carcinoma. Foram evitadas áreas escleróticas, ulceradas e áreas imediatamente adjacentes ao tecido benigno na contagem vascular. A contagem individual dos microvasos foi feita em 3 campos distintos utilizando-se magnificação de 200X (20X objetiva + 10X ocular). Todos os casos foram analisados por dois patologistas individualmente e sem o conhecimento dos dados clínicos e histopatológicos. O resultado da contagem dos microvasos de cada paciente foi representado pela média das somatórias (dos três campos avaliados por cada um dos examinadores).

Na contagem dos microvasos foram consideradas as células coradas em marrom, tanto isoladas quanto agrupadas. As estruturas deveriam ser claramente separadas dos microvasos adjacentes, das células tumorais e de outros elementos do tecido conectivo. Estruturas ramificadas, que não perdiam a sua continuidade durante o trajeto, foram contadas como vasos únicos; e um único vaso, submetido a mais de um corte transversal, foi contado de forma distinta em cada um dos cortes. Grandes vasos com parede muscular espessa foram excluídos da contagem. A visualização do lúmen não foi necessária para identificação dos vasos.

A contagem microvascular foi feita individualmente com os anticorpos monoclonais CD31, CD34 e Fator VIII; e os pacientes foram estratificados, em cada grupo, como pacientes com tumores bem vascularizados e pacientes com tumores pouco vascularizados. À

estratificação utilizou-se, como parâmetro de corte, o valor da mediana da contagem dos vasos para cada anticorpo, especificamente.

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO POR INTENSIDADE DE VASCULARIZAÇÃO



A – Imunocoloração pelo CD31, tumor pouco vascularizado (≤ 63,1 microvasos)

B – Imunocoloração pelo CD31, tumor bem vascularizado (> 63,1 microvasos)

C – Imunocoloração pelo CD34, tumor pouco vascularizado (≤ 86,4 microvasos)

D – Imunocoloração pelo CD34, tumor bem vascularizado (> 86,4 microvasos)

Avaliação do fator de crescimento

O fator angiogênico VEGF foi avaliado, nos cortes de parafina, através da identificação de imunocoloração castanha ao nível da membrana e citoplasma das células tumorais. Foram considerados como pacientes

VEGF-positivos todos os casos que inequivocamente apresentavam células imunorreatoras, independentemente da quantidade ou intensidade. Os pacientes cujos cortes da parafina não demonstraram qualquer indício de imunorreação ao nível das células tumorais foram considerados como VEGF-negativo.

Os pacientes VEGF-positivos foram estratificados de acordo com a intensidade da imunorreação e segundo o padrão de distribuição das células tumorais coradas. Conforme a intensidade da reatividade, agrupou-se em: 1+ = todos os casos com até 30% das células neoplásicas coradas no corte examinado; 2+ = imunorreação positiva em 30% a 70% das células tumorais e 3+ = os cortes com mais de 70% das células tumorais imunocoradas. Segundo a distribuição das células imunorreatoras, os pacientes foram distribuídos como VEGF-positivo de distribuição focal ou VEGF-positivo de distribuição difusa.

Análise estatística

Os dados dos pacientes analisados foram inseridos em uma base de dados criada a partir do programa Epi Info versão 6.04d. Para a análise dos dados foram utilizados os programas Epi Info e SPSS (Statistical Package for Social Science) versão 10.0.

Em todos os testes foi considerada significância estatística valores de $p<0,05$.

Na análise estatística, para a comparação das médias, foram utilizados o teste t de student, ANOVA (análise de variância) e Kruskall Wallis; e, para a comparação das proporções, utilizou-se o teste do qui quadrado e o teste Exato de Fisher. Na avaliação das correlações entre os diferentes anticorpos monoclonais aplicou-se o Spearman Rank Correlation.

RESULTADOS

4.0 Resultados

4.1. Características da amostra

Nos 89 casos estudados houve predomínio do tipo histológico intestinal com 69,7% da amostra, sendo que o tipo histológico difuso ocorreu em 30,3%. Quanto a diferenciação histológica, dois pacientes (2,2%) apresentaram tumores bem diferenciados; 53 pacientes (59,6%) eram moderadamente diferenciados e 34 (38,2%) eram pouco diferenciados (tabela 2).

Analisou-se o parâmetro tamanho do tumor, tendo sido considerado o diâmetro máximo tumoral. O tamanho dos tumores gástricos variou de 1,2 a 18 cm, tendo como valor médio 5,8 (± 3,0) cm. A tabela 2 demonstra que a maioria dos tumores localizava-se no antro gástrico, ou seja, 58 pacientes (65,9%). Em 4 pacientes (4,5%) o tumor se localizava no fundo, 21 (23,9%) no corpo e 5 (5,7%) em toda a extensão gástrica.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

IDADE	27-89	(59,9 ± 13,8)*
SEXO (Nº DE PACIENTES)		
FEMININO	29	32,6%
MASCULINO	60	67,4%
TIPO HISTOLÓGICO		
INTESTINAL	62	69,7%
DIFUSO	27	30,3%
GRAU HISTOLÓGICO		
BEM DIFERENCIADO	2	2,2%
MOD. DIFERENCIADO	53	59,6%
POUCO DIFERENCIADO	34	38,2%
TAMANHO DO TUMOR (cm) [1]	1,2 – 18	5,8 ± 3,0
LOCALIZAÇÃO DO TUMOR [3]		
FUNDO	4	4,5%
CORPO	21	23,9%
ANTRO	58	65,9%
TODO O ÓRGÃO	5	5,7%
INVASÃO DA PAREDE (Pt)		
T1	11	12,4%
T2	19	21,3%
T3	55	61,8%
T4	04	4,5%
METÁSTASE LINFONODAL(pN) [2, 4]		
N0	33	45,8%
N1	17	23,6%
N2	15	32,6%
N3	07	15,2%
METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)		
POSITIVO	08	9,0%
NEGATIVO	81	91,0%
ESTADIAMENTO (TNM) [4]		
I	18	25,0%
II	15	20,8%
III	26	36,1%
IV	13	18,0%

[1] diâmetro máximo tumoral (avaliados 88 casos)
[2] média ± desvio padrão
[3] região predominante do tumor (avaliados 88 casos)
[4] tumor ≥ 15 linfonodos dissecados

Na tabela 2 os pacientes foram distribuídos de acordo com o estádio (UICC/AJCC) (pTNM), tendo sido os parâmetros da classificação analisados de forma isolada e, posteriormente, agrupados em estádios. Em relação à invasão da parede gástrica pelo tumor (pT), 12,4% dos pacientes apresentavam tumores precoces (pT1) e 87,6% apresentavam tumores avançados (pT2-T4). Na avaliação dos pacientes de acordo com o comprometimento linfonodal, somente foram aceitos para análise os casos com amostragem linfonodal com 15 ou mais linfonodos; assim, somente foram avaliados 72 pacientes. Destes, 33 pacientes (45,8%) demonstraram linfonodos negativos; 17 (23,6%) tinham de 1 a 6 linfonodos positivos; 15 (32,6%) tinham de 7 a 15 linfonodos positivos e 7 (15,2%) tinham mais de 15 linfonodos positivos. Quanto à doença metastática, 9% (8) dos pacientes apresentavam doença à distância, havendo: quatro casos de carcinomatose peritoneal; um caso de carcinomatose associado à metástase hepática; um caso de metástase para o baço; um de suprarrenal e um caso de metástase pulmonar.

Nos pacientes agrupados por estádios foram, mais uma vez, considerados apenas os pacientes com amostragem linfonodal ≥ 15 linfonodos. Nesta estratificação foram encontrados 25,0% (18) dos pacientes no estádio I; 20,8% (15) no estádio II; 36,1% (26) no estádio III e 18,0% (13) no estádio IV.

4.2. Contagem microvascular e correlação com fatores patológicos

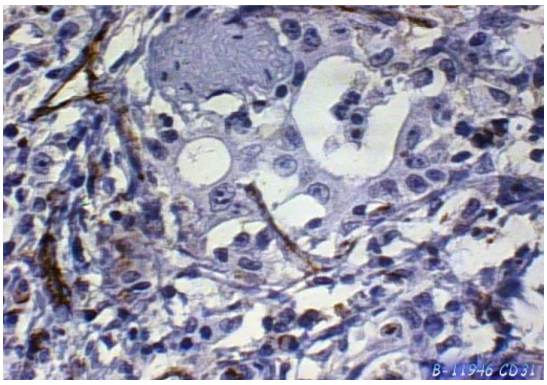
Cada um dos 89 casos do estudo foi submetido a testes imunohistoquímicos com os anticorpos monoclonais CD31, CD34 e Fator VIII. Os testes, que se destinam à coloração das células endoteliais, permitiram a contagem dos microvasos intratumorais.

Na tabela 3 avaliou-se as imunorreações com o anticorpo monoclonal CD31 – e o número de microvasos contados variou de 12,1 a 148,8, com mediana de 63,1, e média de 67,8 (± 31,5). Com o anticorpo monoclonal CD34 o número de vasos variou de 15,4 a 249,1, com mediana de 86,4 e média de 94,2 (± 39,0). Para as reações com o Fator VIII a variação no número de vasos foi expressivamente menor, sendo de 0,0 a 44,6, com mediana de 7,1 e média de 9,2 (± 8,2).

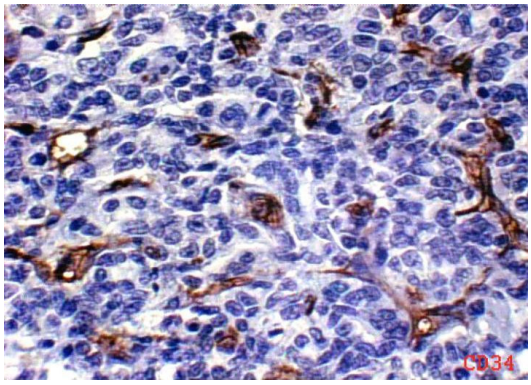
TABELA 3 – DENSIDADE MICROVASCULAR TUMORAL

ANTICORPO	NÚMERO DE MICROVASOS (MEDIANA – MÉDIA ± DP) N=89
CD 31	12,1 – 148,8 (63,1 – 67,8 ± 31,5)
CD 34	15,4 – 249,1 (86,4 – 94,2 ± 39,0)
FATOR VIII	0,0 – 44,6 (7,1 – 9,2 ± 8,2)

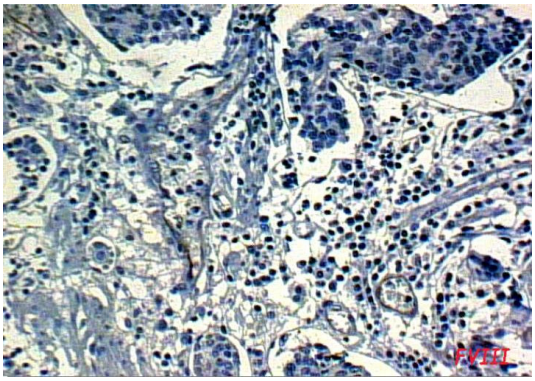
FIGURA 3 – DIFERENÇA NA IMUNOCOLORAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS



CD 31



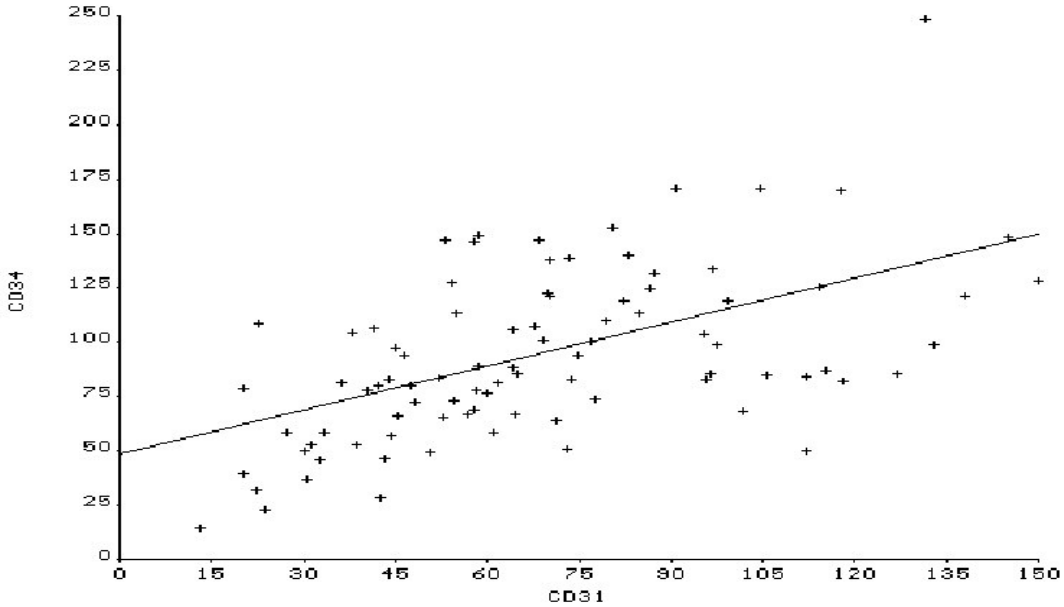
CD 34



FATOR VIII

Quando a contagem dos microvasos obtida pela imunocoloração com os anticorpos monoclonais CD31 e CD34 foi aplicada à curva de correlação de Spearman, observou-se que existe, entre eles, uma correlação linear estatisticamente significante, com $p < 0,01$ e coeficiente $r = 0,570$ (gráfico 1). Esta análise nos permite afirmar que existe correspondência entre os dois marcadores vasculares.

GRÁFICO 1 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE MICROVASOS PELA IMUNOCOLORAÇÃO COM OS ANTICORPOS MONOCLONAIS CD31 E CD34



p < 0,01 (SPEARMAN RANK CORRELATION)

A contagem dos microvasos, através das reações com os anticorpos CD31 e CD34, não demonstrou qualquer tipo de associação com os dados histopatológicos avaliados: tipo histológico, grau de diferenciação, profundidade da invasão da parede gástrica, doença linfonodal, metástase à distância e estádio tumoral (tabela 4).

TABELA 4 – CORRELAÇÃO ENTRE OS FATORES PATOLÓGICOS E A CONTAGEM DE MICROVASOS

	Nº MICROVASOS (MÉDIA ± DP)			
	CD34	p	CD31	p
TIPO HISTOLÓGICO				
INTESTINAL	15,4 –171,5 (92,4 ± 34,7)		12,1 – 148,8 (71,1 ± 29,7)	
DIFUSO	23,6 – 249,1 (98,4 ± 47,9)	0,77	19,3 – 130,6 (60,1 ± 29,7)	0,13

continua

conclusão

GRAU HISTOLÓGICO				
BEM DIFERENCIADO	80,5 – 82,0 (81,2 ± 1,0)		35,0 – 41,1 (38,0 ± 4,3)	
MOD. DIFERENCIADO	29,0 – 171,5 (93,8 ± 32,2)		19,1 – 148,8 (71,0 ± 31,4)	
POUCO DIFERENCIADO	15,4 – 249,1 (95,6 ± 49,0)	0,81	12,1 – 130,6 (64,4 ± 31,9)	0,27
TAMANHO DO TUMOR				
< 3 cm	32,9 – 147,8 (90,7 ± 34,6)		21,4 – 113,0 (52,9 ± 25,2)	
≥ 3 cm	15,4 – 149,1 (95,0 ± 39,6)	0,71	12,1 – 148,8 (70,4 ± 32,0)	0,06
INVASÃO DA PAREDE (pT)*				
PRECOCE	51,0 – 153,4 (108,6 ± 35,0)		19,3 – 113,0 (59,7 ± 28,3)	
AVANÇADO	15,4 – 249,1 (92,2 ± 39,3)	0,64	12,1 – 148,8 (68,9 ± 32,0)	0,62
METÁSTASE LINFONODAL (pN)**				
NEGATIVO	15,4 – 153,4 (90,6 ± 34,9)		12,1 – 148,8 (67,7 ± 34,5)	
N1	40,6 – 171,1 (95,6 ± 39,3)		19,1 – 131,9 (76,5 ± 30,4)	
N2	29,0 – 249,1 (96,6 ± 51,9)		26,3 – 130,6 (63,8 ± 29,4)	
N3	23,6 – 149,3 (93,9 ± 45,5)	0,96	21,6 – 143,8 (65,5 ± 44,3)	0,72
METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)				
NEGATIVO	15,4 – 249,1 (94,7 ± 40,1)		12,1 – 148,8 (67,6 ± 32,1)	
POSITIVO	49,9 – 123,6 (89,5 ± 25,7)	0,72	40,3 – 114,3 (69,6 ± 27,4)	0,86
ESTADIAMENTO (TNM)				
I	15,4 – 153,4 (94,6 ± 40,7)		12,1 – 148,8 (63,8 ± 40,7)	
II	51,3 – 147,6 (94,8 ± 30,4)		43,0 – 125,9 (67,2 ± 21,8)	
III	29,0 – 249,1 (93,7 ± 48,1)		19,1 – 131,9 (72,3 ± 32,5)	
IV	23,6 – 149,3 (89,3 ± 35,7)	0,28	21,6 – 143,8 (70,2 ± 36,7)	0,86
VEGF				
POSITIVO	15,4 – 171,1 (79,5 ± 45,0)		12,1 – 148,8 (54,4 ± 36,8)	
NEGATIVO	23,6 – 249,1 (97,5 ± 37,1)	0,31	19,1 – 143,8 (70,7 ± 29,8)	0,27

* PRECOCE = T1; AVANÇADO = T2, T3 e T4 **NÚMERO DE LINFONODOS ≥ 15

Na tabela 4 demonstrou-se que nos tumores ≥3cm , em seu maior diâmetro, houve maior contagem de microvasos na imunocoloração com CD31, quando comparados com o grupo de tumores com < 3 cm; entretanto, não foi estatisticamente significativa (p=0,06).

Não foram encontradas associações entre os fatores histopatológicos e a contagem de microvasos, quando estratificaram-se os tumores em grupos pouco vascularizados e bem vascularizados; tanto para o CD31, quanto para o CD34 (tabelas 5 e 6).

TABELA 5 – CORRELAÇÃO ENTRE FATORES PATOLÓGICOS E A INTENSIDADE DE VASCULARIZAÇÃO COM CD31

	POUCO VASCULARIZADO ≤ 63,1 VASOS	BEM VASCULARIZADO > 63,1 VASOS	p
TIPO HISTOLÓGICO			
INTESTINAL	28 (45,2%)	34 (54,8%)	
DIFUSO	17 (63,0%)	10 (37,0%)	0,12
GRAU HISTOLÓGICO			
BEM DIFERENCIADO	2 (100,0%)	0 (0,0%)	
MOD. DIFERENCIADO	24 (45,3%)	29 (54,7%)	
POUCO DIFERENCIADO	19 (55,9%)	15 (44,1%)	0,23
TAMANHO DO TUMOR			
< 3 cm	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
≥ 3 cm	35 (48,6%)	37 (51,4%)	0,17
INVASÃO DA PAREDE (pT)			
PRECOCE	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
AVANÇADA	40 (51,3%)	38 (48,7%)	0,71
METÁSTASE LINFONODAL (Pn)			
N0	17 (51,5%)	16 (48,5%)	
N1	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
N2	8 (53,3%)	7 (46,7%)	0,97
METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)			
POSITIVO	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
NEGATIVO	41 (50,6%)	40 (49,4%)	0,97
ESTADIAMENTO (TNM)			
I	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
II	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
III	11 (45,8%)	13 (54,2%)	
IV	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,76
VEGF			
POSITIVO	33 (45,2%)	40 (54,8%)	
NEGATIVO	12 (75,5%)	4 (25,0%)	0,03

TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE FATORES PATOLÓGICOS E A INTENSIDADE DE VASCULARIZAÇÃO COM CD34

	POUCO VASCULARIZADO ≤ 86 VASOS	BEM VASCULARIZADO > 86 VASOS	p
TIPO HISTOLÓGICO			
INTESTINAL	31 (50,0%)	31 (50,0%)	
DIFUSO	14 (51,9%)	13 (48,1%)	0,82
GRAU HISTOLÓGICO			
BEM DIFERENCIADO	2 (100,0%)	0 (0,0%)	
MOD. DIFERENCIADO	25 (47,2%)	28 (52,8%)	
POUCO DIFERENCIADO	18 (52,9%)	16 (47,1%)	0,32
TAMANHO DO TUMOR			
< 3 cm	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
≥ 3 cm	36 (50,0%)	36 (50,0%)	0,79
INVASÃO DA PAREDE (pT)			
PRECOCE	3 (27,3%)	8 (72,7%)	
AVANÇADA	42 (53,8%)	36 (46,2%)	0,10
METÁSTASE LINFONODAL (pN)			
N0	19 (57,6%)	14 (42,4%)	
N1	9 (52,9%)	8 (47,1%)	
N2	8 (53,3%)	7 (46,7%)	
N3	2 (28,6%)	5 (71,4%)	0,58
METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)			
POSITIVO	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
NEGATIVO	42 (51,9%)	39 (48,1%)	0,44
ESTADIAMENTO (TNM)			
I	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
II	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
III	13 (54,2%)	11 (45,8%)	
IV	5 (38,5%)	8 (61,5%)	0,71
VEGF			
POSITIVO	34 (46,6%)	39 (53,4%)	
NEGATIVO	11 (68,8%)	5 (31,3%)	0,11

4.3. Avaliação do fator de crescimento

Detectou-se o fator angiogênico VEGF em 73 pacientes (82%). Quarenta e oito pacientes (53,9%) foram classificados como VEGF 1+; 16 (18%) como VEGF 2+ e 9 (10,1%) como VEGF 3+ (figura 4). Dos 89 pacientes avaliados, 16 (18%) foram negativos para a imunocoloração com o anticorpo monoclonal VEGF (tabela 7).

Dentre os 73 pacientes VEGF-positivos, 47 (64,4%) apresentavam distribuição das células tumorais coradas de forma difusa; e 26 (35,6%) de forma focal (tabela 8; figura 5).

Entre os tumores VEGF-positivos houve maior número de casos considerados bem vascularizados (54,8%) através da imunocoloração com o anticorpo monoclonal CD31; e os tumores VEGF-negativos demonstraram maior número de casos pouco vascularizados (75,0%), sendo estatisticamente significativo com p=0,03 (tabela 5). O mesmo foi observado em relação ao anticorpo monoclonal CD34, mas sem significância estatística (tabela 6).

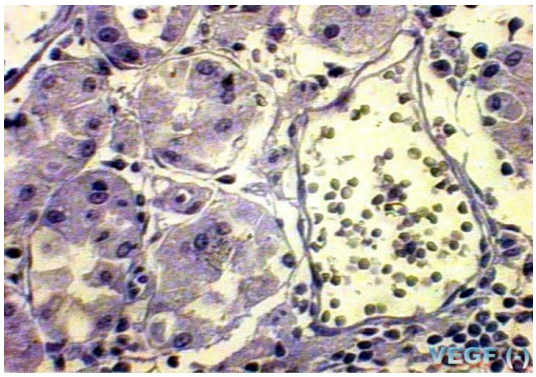
TABELA 7 – DISTRIBUIÇÃO DO VEGF QUANTO A COLORAÇÃO

VEGF – COLORAÇÃO		n = 89 CASOS	TOTAL
NEGATIVO		16 (18%)	16 (18%)
	1+	48 (53,9%)	
POSITIVO	2+	16 (18%)	73 (82%)
	3+	9 (10,1%)	

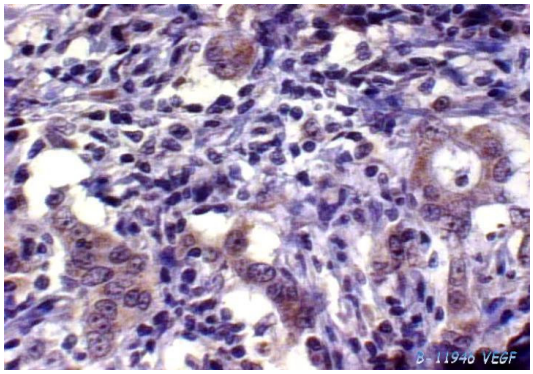
CASOS NEGATIVOS: NÃO CORADOS

CASOS POSITIVOS: COLORAÇÃO COM INTENSIDADE 1+, 2+ e 3+

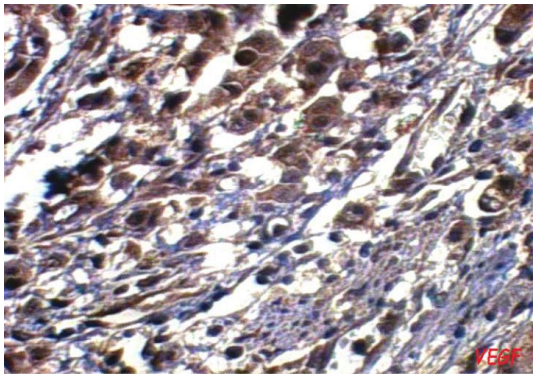
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO VEGF DE ACORDO COM A INTENSIDADE DE COLORAÇÃO



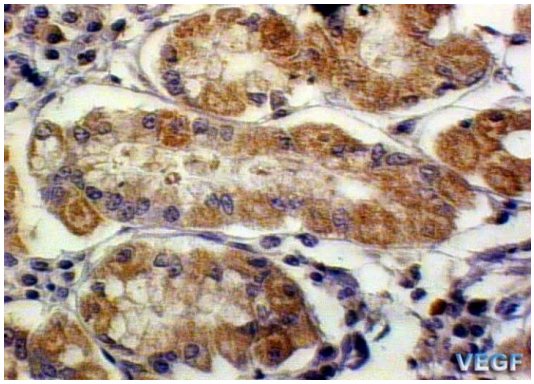
VEGF NEGATIVO



VEGF 1+



VEGF 2+



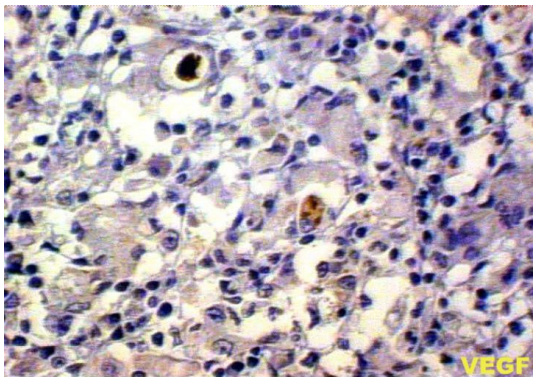
VEGF 3+

TABELA 8 – CLASSIFICAÇÃO DO VEGF SEGUNDO O PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DOS VASOS

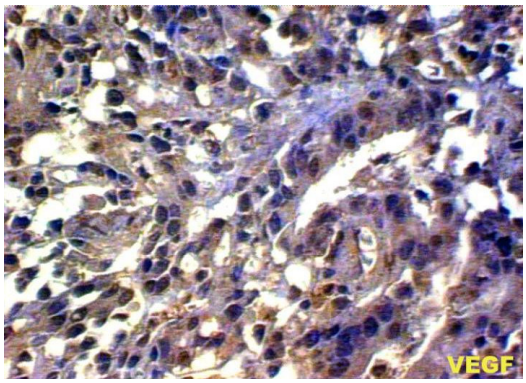
VEGF - DISTRIBUIÇÃO	n = 73*
DIFUSO	47 (64,4%)
FOCAL	26 (35,6%)

* CASOS VEGF POSITIVOS

FIGURA 5 – CLASSIFICAÇÃO DO VEGF DE ACORDO COM A DISTRIBUIÇÃO DA COLORAÇÃO



Focal



Difuso

Dentre os fatores histopatológicos avaliados, somente o agrupamento tumoral em estágios (TNM) demonstrou correlação com o fator angiogênico VEGF. O VEGF apresentou maior positividade quanto mais avançado o estádio tumoral, demonstrando valor de p=0,007 (tabela 9).

TABELA 9 – CORRELAÇÃO ENTRE OS FATORES PATOLÓGICOS E A IMUNOEXPRESSÃO DO VEGF

	Nº DE CASOS (%) – n=89		
	VEGF-NEGATIVO	VEGF-POSITIVO	p
TIPO HISTOLÓGICO			
INTESTINAL	10 (16,1%)	52 (83,9%)	
DIFUSO	6 (22,2%)	21 (77,8%)	0,49
GRAU HISTOLÓGICO			
BEM DIFERENCIADO	1 (50,0%)	1 (50,0%)	
MOD. DIFERENCIADO	7 (13,2%)	46 (86,8%)	
POUCO DIFERENCIADO	8 (23,5%)	26 (76,5%)	0,23
TAMANHO DO TUMOR			
< 3 cm	3 (23,1%)	10 (76,9%)	
≥ 3 cm	12 (16,7%)	60 (83,3%)	0,57
INVASÃO DA PAREDE (pT)			
PRECOCE	2 (18,2%)	9 (81,8%)	
AVANÇADO	14 (17,9%)	64 (82,1%)	0,98
METÁSTASE LINFONODAL(pN)			
N0	9 (27,3%)	24 (72,7%)	
N1	1 (5,9%)	16 (94,1%)	
N2	4 (73,3%)	1 (26,7%)	
N3	0 (0,0%)	7 (100,0%)	0,14
METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)			
NEGATIVO	16 (19,8%)	65 (80,2%)	
POSITIVO	0 (0,0%)	8 (100,0%)	0,16
ESTADIAMENTO (TNM)			
I	8 (44,4%)	10 (55,6%)	
II	1 (6,7%)	14 (93,3%)	
III	5 (19,2%)	21 (80,8%)	
IV	0 (0,0%)	13 (100,0%)	0,007

DISCUSSÃO

5.0 Discussão

Existe considerável evidência clínica e experimental que indica ser o crescimento tumoral dependente da angiogênese (POON; FAN; WONG, 2001). O crescimento e a disseminação metastática dos tumores sólidos necessitam de suporte vascular para suprimento de nutrientes e acesso à circulação (FOLKMAN, 1990). Qualquer aumento da massa tumoral, seja do tumor primário ou da metástase, deve ser acompanhado por aumento dos vasos capilares (FOLKMAN, 1985). Entretanto, pouco se sabe sobre o significado da neovascularização nos carcinomas gástricos (TANIGAWA et al., 1996).

As propriedades angiogênicas têm sido correlacionadas com a agressividade tumoral (WEIDNER et al., 1992) e com a capacidade dos tumores malignos em se expandir localmente e dar metástases à distância (VERMEULEN et al., 1996). Os capilares tumorais neoformados são fenestrados devido à fragmentação da membrana basal, permitindo a penetração das células tumorais na circulação (WEIDNER et al., 1992).

A densidade microvascular intratumoral, avaliada pela coloração imunohistoquímica através de marcadores celulares específicos para células endoteliais, tem demonstrado ser fator prognóstico independente em diferentes tumores sólidos (WEIDNER, 1995), dentre eles, o carcinoma gástrico (MAEDA et al., 1995). Não só a contagem dos microvasos, mas também a identificação dos fatores angiogênicos, como o VEGF, têm sido considerados fatores prognósticos independentes (TANIGAWA et al., 1997).

Na literatura existe uma variação metodológica na técnica imunohistoquímica empregada na avaliação das propriedades angiogênicas tumorais. Importantes aspectos técnicos seriam: seleção dos anticorpos, tipo de fixador usado, método de contagem vascular, cálculo da densidade microvascular, variabilidade inter-observador (especialmente quanto à seleção dos campos a serem contados) e o valor do "ponto de corte" para se caracterizar um tumor como tendo uma vascularização aumentada (VERMEULEN, et al., 2002).

Este estudo obedeceu ao mais recente consenso de metodologia e critérios para quantificação da angiogênese em tumores sólidos, publicado por VERMEULEN, et al. Segundo o consenso, o método padrão para quantificação da angiogênese em cortes de tumores sólidos, utiliza em sua metodologia uma área estimada relativa de microvasos (Contagem de Chalkley), com aplicação da imunocoloração com anticorpos anti-CD34 em um corte tumoral representativo. No estudo da morfometria utiliza-se uma média das três áreas mais vascularizadas dentro do tumor (magnificação 200 X) após seleção manual destas áreas *(hot spots)*, com rastreamento de todo o corte histológico com baixa magnificação (VERMEULEN, et al., 2002).

No estudo em questão, a mensuração da atividade angiogênica tumoral foi realizada de forma direta, através da quantificação dos microvasos intratumorais; e, de forma indireta, com a pesquisa do fator angiogênico VEGF. Para imunocoloração dos microvasos utilizaram-se os anticorpos monoclonais CD34, CD31 e Fator VIII; e a imunocoloração das células tumorais foi realizada com o anticorpo policlonal anti-VEGF. Existe

variabilidade nos diversos trabalhos quanto ao anticorpo adotado para avaliação da DMV. WEIDNER et at., 1992, BOSARI et al., 1992 e TOI; KASHITANI; TOMINAGA, 1993 utilizaram o anticorpo Fator VIII na contagem dos microvasos intratumorais. HORAK et al., 1992 e GASPARINI et al., 1994 utilizaram o CD31 em carcinomas mamários, demonstrando alta sensibilidade para células endoteliais.

O primeiro trabalho que demonstrou a quantificação dos microvasos intratumorais foi publicado em 1991, por WEIDNER et al., tendo sido utilizado, como marcador de células endoteliais, o anticorpo monoclonal Fator VIII em cortes histológicos de carcinomas mamários. Vários outros trabalhos utilizaram o Fator VIII como marcador vascular; porém, obtendo contagem vascular pequena (MAEDA et al., 1995; FRANK et al., 1995; TOMODA et al., 1999) ou contagem com variabilidade e perda da reprodutibilidade (TANIGAWA et al., 1996).

No trabalho de MAEDA et al., 1995, a contagem microvascular, utilizando o Fator VIII como marcador de células endoteliais, variou de 5 a 50 com média de 17,3 ± 10,6 (DP); semelhante aos valores encontrados neste trabalho, ou seja, contagem variando de 0 a 44,6 com média de 9,2 ± 8,2 (DP). Estes valores foram menores que os valores observados na quantificação realizada tanto com o CD31, quanto com o CD34, os quais obtiveram valores de 12,1 a 148,8 com média de 67,8 ± 31,5 e de 15,4 a 249,1 com média de 94,2 ± 39,0, respectivamente.

LINDMARK et al., 1996 utilizaram os anticorpos Fator VIII e CD31, tendo encontrado resultados semelhantes com os dois anticorpos quanto a

contagem vascular. Os autores consideraram a imunocoloração pelo Fator VIII tecnicamente superior e de mais fácil análise.

O trabalho de TANIGAWA et al., 1996, foi o primeiro a avaliar a contagem de microvasos usando o CD34 como marcador de células endoteliais em pacientes com câncer gástrico. O estudo imunohistoquímico usando os dois diferentes anticorpos monoclonais, anti-Fator VIII e anti-CD34, demonstrou que a variabilidade e a perda de reprodutibilidade ocorreu com o anti-Fator VIII, levando a uma errônea baixa contagem dos microvasos tumorais. A contagem de microvasos variou de 15 a 392, com média de 144 ± 77 e mediana de 131 para coloração pelo CD34; e de 4 a 272 com média de 35 ± 36 e mediana de 25 para o a coloração pelo Fator VIII. Segundo a curva de correlação de Spearman houve fraca correlação entre a contagem de microvasos entre os dois anticorpos utilizados ($r=0.521$), apesar de ter demonstrado ser estatisticamente significante ($p< 0,0001$).

Outros investigadores (HOLLINGSWORTH et al., 1995; GRAHAM et al., 1994) também obtiveram maior sensibilidade e acurácia na mensuração da angiogênese tumoral com o CD34.

TOMISAKI et al., 1996, estudaram 175 casos de câncer colorretal avançados, obtendo maior contagem de vasos com o CD34, mas maior especifidade na coloração das células endoteliais com o anticorpo monoclonal Fator VIII. O CD34 corou células inflamatórias e microductos linfáticos, dificultando a contagem microvascular. TANIGAWA et al., 1997, avaliaram 43 casos de carcinoma escamoso esofágico, utilizando para o

estudo dos microvasos os anticorpos monoclonais CD34 e Fator VIII. Os autores obtiveram, na contagem microvascular, média de 135 vasos com o anticorpo CD34 e média de 41 vasos com o anticorpo Fator VIII. A contagem vascular com o Fator VIII representou, aproximadamente, um terço em relação à primeira contagem com o CD34; entretanto, o coeficiente de correlação de Spearman demonstrou que os dois métodos foram igualmente efetivos na detecção dos vasos, na série de casos estudados ($r=0,8005$, $p<0,00001$).

Assim como existe grande variabilidade quanto ao anticorpo utilizado para a imunoreação, também existe grande variabilidade quanto ao número de campos adotados para avaliação da DMV. Neste trabalho foram selecionados três campos de maior contagem de microvasos para cálculo da média da contagem vascular. Na literatura observa-se variação no número de campos contados nos diversos trabalhos, sendo adotado: campo único (WEIDNER et al., 1992); dois campos (ICHIKURA et al., 2001); três campos (FRANK et al., 1995); cinco campos (MAEDA et al., 1995; LINDMARK et al., 1996; TOMODA et al., 1999; MAEHARA et al., 2000; TOMISAKI et al., 1996; TANIGAWA et al., 1997) e dez campos (MARTIN et al., 1995).

A adoção de vários campos e a análise de cada caso por dois patologistas permitem aproximação da média, evitando erros de amostragem. A contagem final dos vasos foi representada pelas médias dos três campos analisados por cada observador, distintamente. As médias foram somadas e divididas por dois. Os casos com discrepância de

contagem foram analisados em reunião conjunta, chegando-se a um consenso.

Vários fatores podem influenciar na interpretação imunohistoquímica, desde a experiência do patologista até a qualidade do material examinado, sendo a presença de artefatos uma das principais fontes de erros do método. Os artefatos de precipitação podem ser confundidos com uma reação positiva e devem ser distinguidos pelo fato da coloração não ficar restrita ao interior das células. Os artefatos de tecido podem ocorrer quando os cortes ficam muito espessos; e os artefatos de células, quando estas se apresentam necróticas ou com compressão extrínsica, podendo originar uma coloração inespecífica. O artefato por coloração de fundo pode ocorrer quando o espécime não foi bem lavado antes de ser processado e, neste caso, macrófagos poderão demonstrar coloração positiva por haverem fagocitado células que continham o antígeno pesquisado (CHEINQUER; CERSKI, 1992).

O método aplicado neste estudo foi o método da streptavidina-biotina, o qual se baseia na habilidade da glicoproteína streptavidina em se ligar, não imunologicamente, a quatro moléculas da vitamina biotina. São utilizados três reagentes na reação: um anticorpo primário específico para a localização do antígeno no tecido (CD31,CD34 e Fator VIII); um anticorpo secundário (LSAB+ - DAKO) conjugado com uma molécula de biotina e com afinidade pelo anticorpo primário e, finalmente, um complexo formado pela enzima peroxidase conjugado à avidina (Strept-ABC), com um local livre na molécula de avidina. Este local permite a ligação com a biotina conjugada ao

anticorpo secundário. O passo final da técnica é a adição de um cromógeno, em geral a DAB (diaminobenzidina) com afinidade pela enzima peroxidade, permitindo assim a visualização do antígeno. O método permite resultados excelentes em material fixado em formalina e incluído em parafina (CHEINQUER; CERSKI, 1992).

As áreas de maior densidade microvascular (*hot spots*) foram identificadas através do rastreamento de toda a extensão da lâmina com um aumento de 100x. Nestas áreas foram contados os microvasos utilizando-se um aumento de 200x (em três campos distintos) na lâmina, em locais marginais da neoplasia invasiva (VERMEULEN et al., 1996).

Na contagem microvascular os observadores consideraram como unidades microvasculares as células que se apresentavam tanto isoladas quanto agrupadas, não havendo, porém, a necessidade de se identificar a luz vascular. Os grandes vasos com parede muscular espessa foram excluídos (SAITO et al., 1999). Um único vaso submetido a mais de um corte transversal foi contado de forma distinta em cada um dos cortes; já os vasos nitidamente ramificados foram contados como um único vaso (VERMEULEN et al., 1996).

A progressão da neoplasia tem sido associada com o fenômeno da formação de novos vasos sanguíneos capilares. O tumor necessita de maior aporte de oxigênio e nutrientes para a extensão local da doença e para aceleração do crescimento tumoral (SHIH et al., 2000). A disseminação da neoplasia também é favorecida pela neovascularização, uma vez que os novos microvasos representam canais que permitem o acesso das células à

circulação. Assim, a associação das características locorregionais e a presença de doença à distância tem sido estudada com relação ao padrão angiogênico tumoral.

Neste trabalho a densidade microvascular não demonstrou associação a fatores anatomopatológicos como: tipo histológico, grau histológico, invasão da parede gástrica, metástase linfonodal, metástase à distância e estadiamento. Este resultado foi similar a outros trabalhos encontrados na literatura (TANIGAWA et al., 1996; TOMISAKI et al., 1996; SAITO et al., 1999; VERMEULEN et al., 1999).

O tipo histológico do câncer gástrico determina padrões diferentes de comportamento. O câncer gástrico do tipo intestinal tende a ser mais exofítico e com disseminação predominantemente hematogênica; o tipo difuso é mais invasivo e apresenta maior disseminação peritoneal. Os fatores responsáveis por este padrão de comportamento não estão bem identificados. TAKAHASHI et al., 1996 obtiveram, na avaliação de 89 casos de adenocarcinoma gástrico, uma correlação estatisticamente significativa entre o tipo histológico e a contagem vascular e entre o tipo histológico e o fator de crescimento VEGF. O câncer gástrico do tipo intestinal apresentou maior contagem de microvasos e maior expressão de VEGF que os tumores do tipo difuso. No presente trabalho o tipo histológico não demonstrou qualquer associação com a DMV ou com o VEGF.

Em relação à extensão tumoral na parede do órgão e a DMV, TANIGAWA et al., 1997 demonstraram, em estudo com carcinomas esofágicos, correlação positiva entre a contagem vascular e a invasão

tumoral da parede esofágica. Os tumores T3 e T4 demonstraram maior quantidade de vasos intratumorais que os tumores T1 e T2 ($p<0,05$), tanto com o anticorpo monoclonal Fator VIII quanto com o CD34. Segundo SHIH et al., 2000, os tumores com invasão profunda da parede esofágica (pT2-4) foram mais freqüentemente considerados de alta DMV; ou seja, apresentaram mais de 60 microvasos/mm² nos cortes histológicos examinados ($p = 0,01$). O mesmo não foi demonstrado no presente protocolo, não havendo qualquer relação do grau de invasão tumoral da parede gástrica e a DMV.

CHE et al., 1998 encontraram aumento da densidade microvascular associado ao aumento de metástases linfonodais e ao aumento do tamanho do tumor, sendo estes valores estatisticamente significativos. TOMODA et al., 1999 identificaram maior densidade microvascular em tumores > 3 cm ($p<0,05$) e TAKEBAYASHI et al., 1996 observaram aumento da densidade microvascular com o aumento do tamanho tumoral ($p<0,001$). No presente trabalho observou-se aumento da densidade de microvasos em relação ao aumento do diâmetro do tumor, porém com $p=0,06$.

MAEDA et al., 1995; TOMODA et al., 1999 e TAKEBAYASHI et al., 1996 relataram maior contagem microvascular na presença de metástase linfonodal com resultados estatisticamente significativos. MAEDA et al., 1995 observaram ainda tendência ao aumento da contagem dos microvasos com a progressão do estadiamento tumoral com $p<0,01$. Esta associação também não foi observada neste protocolo.

Para fins de análise, os tumores foram subdivididos em tumores bem vascularizados e tumores pouco vascularizados, baseando-se na mediana da contagem microvascular obtida com os anticorpos monoclonais CD31 e CD34. No trabalho de TOMISAKI et al., 1996, os tumores foram divididos em tumores de alta e baixa DMV, baseando-se na média da DMV encontrada na coloração com Fator VIII. Tanto o trabalho de TOMISAKI et al., 1996, quanto os trabalhos de SAITO et al., 1999 e TANIGAWA et al., 1997, também subdividem os tumores em grupos bem vascularizados e pouco vascularizados, baseados na média da contagem vascular.

Tem-se demonstrado que a vascularização é necessária para que as células tumorais se disseminem para a corrente sanguínea (FOLKMAN, 1990), possibilitando a ocorrência de doença á distância. No trabalho de VERMEULEN et al., 1999, encontrou-se associação de metástase hematogênica e a intensidade de vascularização tumoral com $p = 0,001$; entretanto, o mesmo não foi observado em relação à densidade de microvasos e a presença ou ausência de metástase linfonodal. TANIGAWA et al., 1996, obtiveram DMV maior para os tumores que desenvolveram metástases após a cirurgia, em relação aos casos não metastáticos. Registraram maior contagem de microvasos os casos com metástases hematogênicas comparados com os casos com metástases peritoneais, com $p<0,001$. Entretanto, em relação à metástase linfonodal, não houve diferença na DMV nos casos com ou sem linfonodos positivos. Nos tumores com metástase linfonodal a contagem dos microvasos obteve média de 146 ± 79, enquanto para o grupo de tumores sem metástase linfonodal foi de 143 ± 74

de média, não havendo diferença significativa nos 107 casos submetidos à ressecção curativa por carcinoma gástrico. WEIDNER et al., 1991, também não encontrou dados que indicassem correlação na contagem de vasos e metástase regional nos casos avaliados. BOSARI et al., 1992 estudando 120 casos de carcinoma mamário, utilizaram o anticorpo anti-Fator VIII e encontraram maior contagem de microvasos nos casos com linfonodos positivos que nos casos com linfonodos negativos; as médias da contagem, foram 99 e 73, respectivamente. As médias apresentaram diferenças estatisticamente significativas, mas por serem pequenas, não foram consideradas conclusivas.

Os mecanismos da angiogênese tumoral têm recebido considerável atenção em recentes estudos. A maioria dos trabalhos tem sido direcionada no sentido de se identificar os vários fatores de crescimento que estimulam a proliferação e a motilidade das células endoteliais que induzem a formação de novos vasos sanguíneos (TANIGAWA et al., 1996). Considerável interesse tem sido demonstrado quanto a possível participação do mitógeno endotelial VEGF e seus receptores no crescimento tumoral. Moléculas estimuladoras do VEGF foram encontradas em células de tumores colorretais humanos e, também, em carcinomas gástricos, usando a imunohistoquímica e a hibridização *in situ* (BROWN et al., 1993).

O VEGF é um dos fatores angiogênicos altamente específicos para o endotélio e funciona como fator de permeabilidade vascular (FERRARA et al., 1989; SENGER et al., 1983). Existe associação positiva entre a expressão do VEGF, a DMV e a agressividade tumoral (TAKAHASHI

et al., 1995; MAEDA et al., 1996; TANIGAWA et al., 1997). Baseando-se nestes dados, acredita-se que o VEGF seja um fator importante na angiogênese tumoral (SHIH et al., 2000).

Nos tumores colorretais também ocorre associação significativa entre a contagem vascular e a expressão do VEGF nas células tumorais (BROWN et al., 1993).

Vários autores têm adotado critérios de graduação para o VEGF. Não há padrões definidos para tal. TANIGAWA et al., 1997, analisaram 163 casos de adenocarcinoma gástrico, tendo realizado o estudo de imunohistoquímico com pesquisa do fator angiogênico VEGF. Este foi graduado em uma escala de 0 a 3+ de acordo com a intensidade de coloração – com 0 representando ausência de coloração detectável e 3+ representando a coloração mais forte nos campos examinados com magnificaçao de 200X.

No trabalho de SHIH et al., 2000 foi adotada, como parâmetro para positividade do VEGF, a imunocoloração positiva de mais de 80% das células tumorais dos cortes histológicos examinados. Os autores obtiveram, em 117 casos de carcinoma escamoso esofágico estudados, um total de 36 (31%) casos VEGF positivo. KNOLL et al., 2001 avaliaram a imunoexpressão do VEGF em tumores pancreáticos. Adotaram, para análise, uma escala de graduação semi-quantitativa, onde os cortes histológicos, demonstrando que < 5% de células tumorais coradas foram considerados como VEGF negativo; 5 a 49% de células tumorais coradas

foram considerados como VEGF (+) e > 50% de células coradas foram considerados como VEGF (++).

No presente trabalho o VEGF foi graduado de 0 a 3+, onde: 0= ausência de células tumorais coradas; 1+ = até 30% de células tumorais coradas; 2+ = de 30% a 70% de células coradas; e 3+ = mais de 70%.

O VEGF é expresso no câncer gástrico; e o aumento desta expressão está associado ao aumento da contagem de microvasos (TOMODA et al., 1999; MAEDA et al., 1996).

No trabalho de TANIGAWA et al., 1997, os tumores considerados bem vascularizados apresentaram maior intensidade de coloração pelo VEGF, com maior número de tumores VEGF 2+ e 3+. Os tumores menos vascularizados tiveram maior número de casos fracamente corados pelo VEGF ($p<0,005$), semelhante ao trabalho em questão, onde os tumores VEGF positivos foram mais bem vascularizados e os tumores VEGF negativos foram em maior número menos vascularizados ($p=0,03$).

TOMODA et al., 1999 e MAEDA et al., 1996 observaram maior DMV nos tumores VEGF positivos que nos tumores VEGF negativos, com resultados estatisticamente significativos. Também no trabalho de SAITO et al., 1999, a DMV foi maior nos casos VEGF positivos (53,6 ± 18,6) que nos casos VEGF negativos (37,4 ± 12,3). MAEDA et al., 1998 obtiveram DMV maior para os casos VEGF positivo (21,7 ± 4,5) do que para os casos VEGF negativos (13,3 ± 6,8) com $p<0,01$; utilizaram, como marcador, o Fator VIII. SHIH et al., 2000 observaram que a DMV, em pacientes VEGF positivo, foi

maior que nos pacientes VEGF negativos, sendo 59,4 e 47,9 respectivamente, mas sem relevância estatística (p = 0,08).

Na correlação do VEGF com fatores anatomopatológicos, KIMURA et al., 2001 demonstraram, em estudo com 102 casos de adenocarcinoma gástrico, não ter encontrado qualquer correlação entre o VEGF, o tipo histológico e a profundidade da invasão tumoral. A expressão de VEGF foi relativamente maior nos tumores com metástases linfonodais, porém, sem significância estatística. MAEDA et al., 1998 estudaram 120 casos de adenocarcinoma gástrico submetidos a tratamento cirúrgico curativo. Encontraram taxa de VEGF significativamente maior em pacientes com metástase linfonodal. SHIH et al., 2000 também obtiveram correlação positiva entre a expressão do VEGF e metástase linfonodal com p<0,04.

A associação positiva da expressão do VEGF com a presença de metástase linfonodal poderia ser justificada pelo fato do VEGF ser mitógeno das células endoteliais e aumentar a permeabilidade da microvasculatura. As células tumorais alcançam a circulação diretamente através dos vasos da via linfática regional que supre o órgão; através das células que alcançam os vasos na junção linfovascular; ou, ainda, o VEGF poderia agir diretamente nos vasos linfáticos e nos vasos sanguíneos, causando invasão direta das células tumorais na circulação linfática. Os vasos sanguíneos e linfáticos têm estruturas semelhantes. Entretanto, nenhum estudo demonstrou ação do VEGF diretamente nos vasos linfáticos (SHIH et al., 2000; BLOOD; ZETTER, 1990).

Nesta pesquisa, a positividade de expressão do VEGF nos 89 pacientes estudados foi de 73 casos (82%). De modo semelhante à observação de MAEDA et al., 1996, não houve associação do VEGF com os parâmetros histopatológicos: tipo histológico, grau histológico, profundidade de invasão tumoral na parede gástrica, metástase linfonodal ou à distância. Entretanto, quanto ao estadiamento (TNM) observou-se correlação positiva – o aumento do estádio clínico foi acompanhado do aumento da positividade do VEGF (p=0,007).

A associação da vascularização tumoral com o modo de metastatização e com a sobrevida global em pacientes com carcinoma gástrico pode ter muitas implicações (TANIGAWA et al., 1996; TEICHER et al., 1994):

1- o acesso da vascularização tumoral pela imunohistoquímica em cortes teciduais embebidos em parafina, pode ser realizado em qualquer laboratório clínico, permitindo que a informação a respeito da angiogênese tumoral aumente a identificação de pacientes de alto risco de recorrência, os quais poderiam se beneficiar de terapia adjuvante;

2- os achados de correlação – entre angiogênese tumoral e modo de metastatização – podem influenciar as descobertas futuras de mecanismos pelos quais a angiogênese tumoral facilite a formação de metástases;

3- algumas drogas antiangiogênicas têm demonstrado ser promissoras no tratamento anti-câncer e o perfil angiogênico tumoral poderia predizer as respostas destes tumores a tais drogas.

CONCLUSÃO

6.0 Conclusões

Dentro das condições de realização da presente pesquisa pode-se concluir que:

1. Os anticorpos monoclonais CD31 e CD34 demonstraram ser bons marcadores na avaliação da densidade microvascular, enquanto o Fator VIII não permitiu avaliação acurada dos vasos tumorais;

2. Houve correlação entre os anticorpos monoclonais CD31 e CD34 com padrão de imunocoloração correspondentes, o mesmo não tendo sido observado com relação ao anticorpo monoclonal Fator VIII;

3. Imunoexpressão aumentada do fator de crescimento VEGF ocorre nos tumores mais avançados (TNM);

4. A imunoexpressão aumentada do VEGF associa-se à maior angiogênese nos tumores. Os casos considerados bem vascularizados pela imunocoloração com o anticorpo monoclonal CD31 apresentaram maior positividade para o fator de crescimento VEGF ($p<0,03$).

ANEXO

TABELA GERAL DE OBSERVAÇÕES

Ordem	Prontuário	Sexo	Idade	Loc. tumor	T1	T2	Invasão	Nº linfonodos	Nº linfonodos +	Grau histológico	Tipo histológico	Metastase	CD 31	CD 34	Fator VIII	VEGF coloração	VEGF distribuição	TNM
1	98102627	M	66	3	4.5	3.0	3	18	4	2	1	0	53.6	73.9	4.3	1	difuso	IIIA
2	98110532	F	61	3	6.0	3.0	3	18	4	2	1	0	76.6	74.8	0	2	difuso	IIIA
3	98110511	M	73	1	7.7	4.0	3	15	0	2	1	0	53.3	127.9	3.1	1	difuso	II
4	98107193	M	39	3	3.5	1.5	1	33	0	3	2	0	45.4	94.6	2.3	0	0	IA
5	98103493	F	85	3	4.5	4.5	3	19	0	2	1	0	63.3	67.3	6.6	3	difuso	II
6	98106359	F	54	3	2.0	1.8	3	11	5	2	1	0	57.4	89.8	1.8	1	difuso	IIIA
7	98101918	M	58	3	3.0	2.5	2	16	0	3	2	0	57.3	149.5	15.9	0	0	IB
8	98104064	M	59	3	5.0	4.0	2	13	0	2	1	0	30.3	53.3	0.3	1	difuso	IB
9	98103844	M	38	3	5.0	5.0	3	11	3	2	1	0	68	101.8	5.1	1	difuso	IIIA
10	98104035	M	63	3	4.5	3.0	3	19	7	2	1	0	39.4	78.8	4.3	1	difuso	IIIB
11	98102637	M	67	3	10.0	8.0	2	26	1	2	1	0	81.3	119.6	2.8	3	difuso	II
12	98108638	M	70	3	4.0	3.0	3	22	6	3	1	0	42.3	47.6	4.5	3	difuso	IIIA
13	98104361	F	34	3	5.0	4.0	2	22	0	2	1	0	136.8	121.6	24.8	1	focal	IB
14	98104090	M	45	3	4.0	2.0	3	22	2	2	1	0	63.0	89.1	5.1	1	focal	IIIA
15	98101367	F	89	3	5.5	5.0	3	42	11	2	1	carcinomatose	83.8	114.1	10.8	1	focal	IV
16	98105786	M	56	4	10.0	10.0	3	25	25	4	1	carcinomatose	43.8	98.0	1.6	1	focal	IV
17	98100624	M	72	3	4.5	3.0	3	15	4	2	1	0	94.6	83.6	8.6	1	focal	IIIA
18	98100708	M	56	2	9.0	7.0	3	31	10	3	2	0	130.6	249.1	4.1	1	difuso	IIIB
19	98109187	F	39	4	7.2	5.0	3	13	4	2	1	0	72.6	83.8	7.8	2	difuso	IIIA
20	98102450	M	67	3	2.6	1.2	1	10	0	2	1	0	36.8	105.4	0.6	1	focal	IA
21	97100069	M	85	3	-	-	1	28	0	2	1	0	69.1	138.5	1	2	difuso	IA
22	97104176	M	84	2	14	10	4	24	0	3	1	baço	114.3	87.6	6.5	1	difuso	IV
23	97105281	F	54	3	5.3	4.0	1	8	0	3	1	0	72.4	139.3	6.0	1	difuso	IA
24	97103176	F	41	3	1.8	1.6	1	14	0	2	1	0	113	126.0	2.5	1	focal	IA
25	98106940	M	68	3	4.0	2.0	3	14	3	2	1	0	103.5	171.5	0.9	2	difuso	IIIA
26	98108058	F	47	4	18.0	8.0	3	27	27	3		0	21.6	109.0	6.3	3	focal	IV
27	98107326	M	60	1	8.0	7.0	3	29	18	2	1	0	143.8	149.3	6.9	1	difuso	IV
28	98107996	F	60	3	1.8	-	1	12	0	2	1	0	69.0	121.6	22.0	1	difuso	IA
29	98108641	M	70	3	2.5	2.5	2	18	8	2	1	0	63.9	86.4	15.0	1	difuso	IIIA
30	98107530	M	35	3	6.0	3.0	4	12	3	3	2	0	57.0	78.8	12.9	1	focal	IV
31	98109776	M	31	2	1.8	1.5	2	19	0	2	1	0	52.3	147.8	4.5	1	difuso	IB
32	97101280	F	54	3	9.4	-	2	31	8	3	2	0	29.4	37.5	0.6	0	0	IIIA
33	97106551	M	58	3	3.5	2.0	3	13	0	3	2	0	31.4	46.9	10.3	1	focal	II
34	97102260	M	44	2	1.2	-	1	6	0	3	2	0	86.0	132.6	5.6	3	difuso	IA
35	97101372	M	57	3	4.5	3.7	2	24	0	2	1	0	148.8	128.9	44.3	0	0	IB
36	97101257	M	63	2	2.0	-	2	18	0	1	1	0	35.0	82.0	7.6	3	focal	IB
37	97101254	M	63	1	-	-	3	14	4	3	2	carcinomatose	68.9	123.6	1.6	2	difuso	IV
38	97102278	F	71	2	7.0	-	3	16	0	4	2	0	71.9	51.3	5.8	1	focal	II
39	97110197	M	53	3	5.0	3.8	3	29	9	3	1	0	70.3	64.6	6.3	1	difuso	IIIB
40	97106181	F	83	3	12.0	7.0	3	22	1	3	2	0	116.9	83.0	16.3	1	focal	IIIA
41	97108254	F	50	2	1.3	0.8	3	26	0	3	2	0	44.3	67.0	9.3	2	difuso	II
42	97101600	M	67	3	3.0	2.2	3	9	0	2	1	0	32.3	59.4	2.6	0	0	II
43	97101055	F	59	4	-	-	3	17	17	3	2	0	22.6	23.6	9.6	1	difuso	IV
44	97103704	M	60	3	9.0	8.0	3	8	0	2	1	0	56.6	69.4	8.4	0	0	II
45	97107367	M	61	3	5,6	5.0	3	19	1	2	1	0	19.1	40.6	7.9	1	difuso	IIIA
46	97109007	M	56	-	5.5	3.2	4	21	0	2	1	0	59.8	59.1	6.6	1	focal	IV
47	97108470	M	76	2	9.3	8.2	3	19	0	3	1	0	125.9	86.1	25.1	1	difuso	II
48	97107900	F	61	2	6.0	3.9	3	15	5	2	1	0	131.9	99.5	19.8	1	focal	IIIA
49	97106815	M	65	3	9.0	5.0	3	43	20	4	2	0	81.9	140.9	18.3	1	focal	IV

continua

conclusão

Ordem	Prontuário	Sexo	Idade	Loc. tumor	T1	T2	Invasão	Nº linfonodos	Nº linfonodos +	Grau histológico	Tipo histológico	Metastase	CD 31	CD 34	Fator VIII	VEGF coloração	VEGF distribuição	TNM
50	97108998	F	50	2	4.2	4.0	2	20	0	3	1	0	12.1	15.4	5.8	0	0	IB
51	97107166	M	42	3	1.3	1.0	3	22	0	3	2	0	43.0	83.3	3.3	0	0	II
52	97106743	F	71	3	3.5	2.0	2	29	0	1	1	0	41.1	80.5	12.4	0	0	IB
53	97104369	F	72	3	7.0	4.5	3	20	10	2	1	0	41.6	29.0	0.4	0	0	IIIA
54	97100886	M	60	4	6.9	3.8	3	11	2	3	1	0	51.8	66.4	13.8	1	difuso	IIIA
55	97106982	M	78	2	12.5	7.5	3	26	1	2	1	0	53.8	114.1	6.6	1	difuso	IIIA
56	97108422	F	77	3	5.0	2.0	3	20	8	2	2	0	94.5	104.3	19.0	1	focal	IIIA
57	97103383	F	48	3	8.5	5.5	3	24	0	2	1	0	75.8	101.1	8.8	1	focal	II
58	98109496	M	67	3	4.3	2.9	3	29	6	2	1	0	78.4	111.0	15.9	2	difuso	IIIA
59	97102850	F	80	3	6.5	4.0	3	29	5	3	1	0	116.6	170.9	8.9	1	difuso	IIIA
60	97101726	M	59	3	6.0	4.0	3	19	2	2	1	0	89.8	171.1	3.8	0	0	IIIA
61	97110438	F	66	1	6.5	6.0	2	42	0	2	1	0	51.1	84.3	14.1	1	focal	IB
62	97109430	M	63	2	5.0	3	3	23	0	3	1	0	43.3	57.6	1.1	1	difuso	II
63	97101596	M	64	3	7.0	3.5	3	32	0	3	1	0	58.9	77.1	13.3	1	focal	II
64	98107445	M	63	2	3.8	2.0	2	25	0	2	1	0	104.6	86.0	7.9	2	difuso	IB
65	98106896	F	59	3	3.4	1.9	1	25	0	3	2	0	79.4	153.4	15.0	2	difuso	IA
66	98107973	F	27	2	8.0	6.0	4	15	1	2	2	suprarrenal	55.6	67.4	2.6	3	difuso	IV
67	98106966	M	59	3	8.0	7.0	3	-	-	2	1	0	73.8	94.6	8.9	2	focal	-
68	97108497	M	64	3	4.5	3.5	3	27	12	3	2	0	47	72.8	6.8	1	focal	IIIB
69	97104572	M	42	2	7.0	6.5	3	29	11	2	1	0	46.4	81.1	7.1	1	focal	IIIB
70	98106785	M	75	2	4.0	3.6	3	15	13	4	1	0	85.4	125.5	7.5	0	0	IIIB
71	97100799	M	45	3	10.0	10.0	3	22	12	3	2	0	63.1	106.5	11.4	1	focal	IIIB
72	99108371	M	83	3	5.5	5.5	3	67	54	2	1	figado + carcinomatose	49.6	49.9	8.6	2	difuso	IV
73	97104983	M	60	3	1.7	1.2	2	28	0	3	2	0	21.4	32.9	30.8	0	0	IB
74	99102602	M	64	3	6.0	5.0	2	17	12	2	1	0	95.8	134.3	16.8	3	difuso	IIIA
75	99104927	M	34	2	9.0	8.0	3	25	0	2	1	pulmonar	100.6	68.6	6.6	2	focal	IV
76	97104862	M	45	3	8.2	6.9	2	15	2	3	2	0	56.6	147.0	14.6	1	difuso	II
77	99106336	M	80	3	6.5	4.5	3	18	0	2	1	0	96.3	99.6	4.0	1	difuso	II
78	99104292	M	74	2	9.8	5.4	3	17	9	2	1	0	26.3	59.0	1.3	0	0	IIIB
79	99104941	M	41	3	5.0	4.0	3	35	0	2	1	0	66.6	107.6	17.0	1	difuso	II
80	99104664	M	56	3	2.2	2.0	1	19	0	2	1	0	37.6	53.6	8.0	1	difuso	IA
81	99103898	M	63	3	7.0	-	3	15	12	2	2	carcinomatose	40.3	107.3	8.0	2	difuso	IV
82	99105281	F	64	3	7.5	6.0	3	17	6	2	1	0	111.0	50.6	15.6	1	difuso	IIIA
83	99104367	M	59	3	4.5	4.5	2	22	0	2	1	0	98.3	119.6	2.3	1	focal	IB
84	99107956	F	71	3	2.0	1.5	1	24	0	2	1	0	29.0	51.0	15.6	0	0	IA
85	99102473	F	73	2	5.0	4.0	3	20	0	3	2	0	67.3	147.6	5.6	2	difuso	II
86	99102301	F	52	2	-	-	2	17	0	3	2	0	111.0	85.3	4.3	0	0	IB
87	99101498	M	32	3	3.5	3.2	2	23	5	2	2	0	60.6	82.0	9.3	2	difuso	II
88	99106882	M	59	2	9.0	8.5	3	38	19	2	1	0	95.3	86.6	44.6	2	difuso	IV
89	99108372	M	64	3	4.5	3.0	1	22	0	2	2	0	19.3	79.3	8.0	3	difuso	IA

Loc. tumor = Localização do tumor no estômago (1 = Fundo; 2 = Corpo; 3 = Ântro; 4 = Todo o estômago)
T1 e T2 = Maiores diâmetros tumorais
Invasão = Estadiamento patológico de T (1 = pT1; 2 = pT2; 3 = pT3; 4 = pT4)
Nº linfonodos = Quantidade total de linfonodos dissecados
Nº linfonodos + = Total de linfonodos comprometidos pela neoplasia no total dissecado
Tipo histológico = Classificação de Laurén (1 = Intestinal; 2 = Difuso)
Metástase = Estadiamento patológico de M (0 = Ausência de metástase)
CD 31 = Número de microvasos imunocorados pelo anticorpo CD 31
CD 34 = Número de microvasos imunocorados pelo anticorpo CD 34
Fator VIII = Número de microvasos imunocorados pelo anticorpo Fator VIII
VEGF coloração = Intensidade da imunorreação (0 = VEGF - ; 1 = VEGF 1+ ; 2 = VEGF 2+ ; 3 = VEGF 3+)
VEGF distribuição = Padrão de distribuição das células imunocoradas (0 = VEGF -)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.0 Referências Bibliográficas

ANTHONY, P.P.; RANANI, P. Endothelial markers in malignant vasculars tumours of the liver: superiority of QB-END/10 over von Willebrand factor and Ulex europaues agglutinin 1. **J. Clin Pathol**., v.44, n.1, p.29-32, 1991.

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

ALGIRE, G.H. et al. Vascular reaction of normal and malignant tumors in vivo, vascular reactions of nice to wounds and to normal and neoplastic transplants. **J. Nath. Cancer Inst**., v.6, p.73-85, 1945.

AUERBACH, W.; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. **Pharmacol. Ther.**, v.63, p.265, 1994.

BOSARI, S. et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. **Hum. Pathol.**, v.23, p.755-761, 1992.

BLOOD, C,H.; ZETTER, B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1032, p.89-118, 1990.

BROWN, L.F. et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. **Cancer Res.**, v.53, p.4727-4735, 1993.

CHE, X. et al. Tumor angiogenesis related to grow pattern and lymph node metastasis in early gastric cancer. **Chin. Med. J.** (Engl), v.111, n.12, p.1090-3, dec., 1998.

CHEINQUER, H.; CERSKI, C.T.S. Técnicas e aplicações imuno-histoquímicas. In: FLECK, J.F. **Câncer-integração clínico-biológica.** [S.l.], Médica e Científica, 1992.

FERRARA, N.; HENZEL, W.J. **Biochen. Biophys. Res. Commun**., v. 161, p.851, 1989.

FOX, S.B. et al. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinoma relationship to epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.29, p.109-116, 1994.

FOLKMAN, J**. Important advances in oncology**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1985. p.42-62.

FOLKMAN, J. in XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis (Verstraet, M; Vermylen, J; Lignen, R; and Arnout, J; end) pp.583-596, Leuven University Press, Leuven. (1987).

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v.235, p.442-47,1987.

FOLKMAN, J. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, v.339, p.56-61, 1989.

FOLKMAN, J. Tumor angiogênesis: therapeutic implication**. N. Engl. J. Med.,** v.285, p.1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. What is the evidence that the tumors are angiogenesis-dependent? **J. Natl. Cancer Inst.**, v.82, p.4-6, 1990.

FOLKMAN, J. in **Cancer Medicine** (Holland, J. F; Frei, E; Bast, R. C; Kufe, D. W; Morton, D. I; and Weichselbaum, R. R; eds) 3rd Ed, in press. (1992)

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.10931-10934, 1992.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **N. Engl. J. Med.**, v.333, p.1757-1763, 1995.

FOLKMAN, J. **Antiangiogenic therapy cancer**: principles e practice of oncology. 5. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997.

FRANK, R.E. et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. **Ann. Surg.,** v.222, v.6, p.695-699, 1995.

GASPARINI, G.; WEIDNER, N. Tumor microvessel density, p53 expression tumor size. **J. Clin. Oncol.**, v.12, p.454-466, 1994.

GRAHAM, C.H. et al. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0,76mm) malignant melanoma. **Am. J. Pathol.**, v.145, n.3, p.510-514, 1994.

HAMADA, J. et al. Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. **Br. J. Cancer,** v.66, p.349, 1992.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell,** v.86, n.3, p.353-364, 1996.

HERTIG, A.T. **Contrib. Embryol.**, v.25, p.37, 1935.

HOLMGREN, L.; O`REILLY, M.S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat. Med.,** v.1, n.2, p.149-153, 1995.

HOLLINGSWORTH, H.C. et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. **Am. J. Pathol.**, v.147, n.1, p.33-41, 1995.

HORAK, E. et al. Angiogenesis, essessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. **Lancet**, v.340, p.1120-24, 1992.

HSU S.M.; RAINE L.; FANGER H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v.29, p.577-80, 1981.

HUNDMARMARK, G. et al. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. **J. Clin. Oncol**., v.14, p.461-466, 1996.

ICHIMURA,T. et al. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma**. J. Surg. Oncol.**, v.78, p.132-137, 2001.

JUNG, Y.D. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. **Eur. J. Cancer**, v.38, n.8, p.1133-1140, 2002.

KAKEJI, Y. Angiogenesis as a target for gastric cancer. **Surgery**, v.131, p.S48-54, 2002.

KIMURA, H. et al. Prognostic significance of expression of thimidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. **J. Surg. Oncol.**, v.76, p.31-36, 2001.

KNOLL, M.R. et al. Correlation of postoperative survival and angiogenic growth factors in pancreatic carcinoma. **Hepatogastroenterology**, v.48, p.1162-1165, 2001.

LAURÉN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so calted intestinal-type carcinoma. **Acta Path. Microbiol. Scand**., v.29, p.26-44, 1965.

LEUNG, D.W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v.246, p.1306-1309, 1989.

LINDMARK, G.; GERDIN, B.; SENDBERG, C.; PAHLMAN, L., et al. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v.14, p.461-66, 1996.

LIOTTA, L.A.; STRACKE, M.L: Tumor invasion and metastases: Biochemical mechanisms. **Cancer Treat. Res.**, v.40, p.223-238, 1998.

MAEDA, K. et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v.13, p.577-8, 1995.

MAEDA, K. et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. **Cancer**, v.77, p.858-63, 1996.

MAEDA, K. et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. **Oncology**, v.55, p.594-599, 1998.

MAEHARA, Y. et al. Vascular invasion and potencial for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. **Surgery,** v. 28, p.408-16, 2000.

MARTIN, L. et al. Standardising the methodology of vessel density in breast cancer using immuno-histochemistry and tumour microangiography. **The Breast**, v.4, p.227-257, 1995.

PADRO, T. et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v.95, p.2637-2644, 2000.

POLVERINI, P.; LEIBOVICH, J.S. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages**. Lab. Invest.**, v.51, p.635, 1984.

POON, R.T.; FAN, S.T.; WONG, J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. **J. Clin. Oncol.**, v.19, p.1207-1225, 2001.

RAK, J. et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer Metas Rev.,** v.14, p.263, 1995.

RIBEIRO JR, U. et al. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. **Cancer**, v.83, n.1, p.7-18, 1998.

SAITO, H. et al. Neoangiogenesis and relationship to nuclear p53 accumulation and vascular endothelial growth factor expression in advanced gastric carcinoma. Oncology, v.57, p.164-172, 1999.

SAFATLE-RIBEIRO A.V. et al. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and in the intact stomach. **Cancer**, v.78, p.2288-99, 1996.

SHIH, C-H. et al. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin. Cancer Res.,** v.6, p.1161-1168, 2000.

SENGER, D.R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v.219,n.4, p.983-5, 1983.

TAKAHASHI, Y. et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. **Arch. Surg.**, v.132, p.541-546, 1997.

TANIGAWA, N. et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. **Cancer Res.**, v.56, p.2671-1676, 1996.

TANIGAWA, N. et al. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. **J. Clin. Oncol.,** v.15, p.826-32, 1997.

TANIGAWA, N. et al. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v.79, p.220-225, 1997.

TAKEBAYASHI, Y. et al. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. **Cancer,** v.78, p.226-231, 1996.

TAKAHASHI, Y. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. **Cancer Res.**, v.55, p.3964-3968, 1995.

TOI, M.; KASHITANI, J.; TOMINAGA, T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. **Int. J. Cancer,** v.55, p.371-4, 1993.

TOMISAKI, S. et al. Microvessel quantification and its posible relation with liver metastasis in colorectal cancer. **Cancer**, v.77, p.1722-28, 1996.

TOMODA, M. et al. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. **Cancer,** v.85, p.2340-46, 1999.

TEICHER, B.A. et al. Potentiation of citotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. **Int. J. Cancer**, v.57, p.920-925, 1994.

VACCA, A. et al. Angiogenesis extent and macrophage density simultaneously with pathological progression in B-cell non Hodgkin´s lymphomas. **Br. J. Cancer,** v.79, p.965-970, 1999.

VARTANIAN, R.; WEIDNER, N. Correlation of intratumoral endothelial-cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell-proliferation in breast carcinoma. **Am. J. Pathol.**, v,144, p.1188-1194, 1994.

VERMEULEN, P.B. et al. Quantification of angiogenese in solid human tumors: an International Consensus on the Methodology and Criteria of Evaluation. **Eur. J. Cancer**, v.32A, p.2474-84, 1996.

VERMEULEN, P.B. et al. Prospective study of intramural microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. **Brit. J. Cancer,** v.79, n.2, p.316-322, 1999.

VERMEULEN, P.B. et al. Second international concensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. **Eur. J. Cancer**, v.38, p.1564-1579, 2002.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.1-8, 1991.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenese: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. **J. Nath. Cancer Inst.**, v.84, p.1875-87, 1992.

WEIDNER, N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. **Am. J. Pathl.,** v.147, p.9-19, 1995.

WEIDNER, N.; FOLKMAN, J. **Important Advances in oncology**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996.

WENG, D.E. Angiogenesis. **Horizons in cancer therapeutics**, v.1, n.1, 2000.