

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTADIAMENTO E SOBREVIVÊNCIA NO CÂNCER GÁSTRICO:  
PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF-A)**

**LUCIANO SILVEIRA EIFLER**

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTADIAMENTO E SOBREVIDA NO CÂNCER GÁSTRICO:  
PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF-A)**

**LUCIANO SILVEIRA EIFLER**

Orientador(a): Norma Possa Marroni

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2012

CIP – Catalogação na Publicação

Eifler, Luciano Silveira

Estadiamento e sobrevida no câncer gástrico: papel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF-A) / Luciano Silveira Eifler. – 2012.  
100 f.

Orientadora: Norma Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. VEGF-A 2. Angiogênese 3. Estadiamento 4. Prognóstico 5. Câncer gástrico I.Marroni, Norma Possa, Orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Dra. Norma Possa Marroni, pelo privilégio do convívio, pela orientação neste trabalho e pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e paixão pela pesquisa científica e experimental.

Aos Professores do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do Hospital de Clínicas/UFRGS, minha admiração pelo nível de excelência alcançado.

Ao Mestrando Luiz Felipe Forgiarini, e Doutorandos Darlan Pase da Rosa, Graziella Rodrigues e Silvia Bona pelo auxílio na confecção da dissertação.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS pelas cobranças necessárias e informações prestadas ao longo do curso.

Ao grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio durante todas etapas do estudo e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) pelo financiamento dos reagentes e recursos para a realização da pesquisa.

À Faculdade de Medicina da PUCRS e Serviço de Patologia pelo fornecimento das lâminas contendo as amostras de tecido utilizadas neste estudo.

Ao Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski pelo auxílio e parecer nos exames imunohistoquímicos.

Ao Professor Mário Wagner pela consultoria e análise estatística deste trabalho.

Ao Dr. Hamilton Petry de Souza pela participação na minha formação como Cirurgião e pelo modelo de humanismo e dedicação aos pacientes.

Ao amigo e colega Dr. Marcelo Garcia Toneto pela confiança na continuidade da pesquisa em angiogênese no câncer gástrico por ele iniciada.

Ao amigo Luiz Carlos Ferreira, neurocirurgião e colega de faculdade pelo incentivo no término deste trabalho.

Ao Dr. Cláudio Augusto Marroni pelo auxílio na revisão da dissertação.

Aos meus pais Silvio Veloso Eifler e Glecy Silveira Eifler por terem proporcionado a minha formação e servirem de base para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha irmã Adriana Silveira Eifler sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À minha esposa Sabine Possa Marroni, por sua paciência e disposição em auxiliar na conclusão deste trabalho e por seu companheirismo e dedicação aos nossos projetos de vida.

Aos pacientes que serviram de base para a realização deste estudo.

*"What if cancerous tumors, in order to expand,  
needed to trigger the growth of new blood vessels to feed themselves?  
And if that was true, what if a way could be found to stop that growth?  
Could cancers be starved to death?"*

*Dr. Judah Folkman (1933-2008) descobriu uma nova abordagem na batalha  
contra o câncer: atacar os vasos sanguíneos que nutrem as células cancerosas.  
Os resultados de seus experimentos foram promissores o bastante  
para trazer esperança a pacientes e médicos em todo o mundo.*

**Dr. Folkman's War**

(Angiogenesis and the Struggle to Defeat Cancer)

## RESUMO

**Introdução:** O Fator de Crescimento Endotelial Vascular - A (VEGF) é um dos principais promotores da angiogênese e demonstra relação com prognóstico no câncer gástrico (CG). **Objetivos:** Correlacionar a expressão imunoistoquímica do VEGF com o estadiamento e sobrevida no câncer gástrico. **Métodos:** 45 espécimes de adenocarcinomas foram avaliados para expressão imunoistoquímica do VEGF. O estadiamento patológico (pTNM), características histológicas e sobrevida foram avaliados empregando os testes ANOVA, análise multivariada e curva de Kaplan-Meier. **Resultados:** Foi observada maior expressão do VEGF na comparação entre os estadiamentos IA e IB vs II,III e IV ( $p < 0,001$ ). O VEGF menos expresso estava relacionado com maior penetração do tumor na parede gástrica ( $p < 0,003$ ) e presença de comprometimento linfonodal ( $p < 0,001$ ). Pacientes apresentando tumores com maior expressão de VEGF tiveram maior sobrevida (HR 0,37; IC 95%: 0,17-0,79). **Conclusão:** Houve associação inversa na expressão do VEGF com o estadiamento dos tumores gástricos. A análise multivariada demonstra a expressão do VEGF como fator prognóstico independente na sobrevida dos pacientes com câncer gástrico.

**Descritores:** VEGF-A, Angiogênese, Estadiamento, Prognóstico, Câncer gástrico.

## ABSTRACT

**Background:** Vascular endothelial growth factor A (VEGF) is one of the main promoters of angiogenesis and correlates with gastric cancer (GC) prognosis.

**Aims:** To evaluate the correlation between immunohistochemical VEGF expression and the gastric cancer stage and survival rate. **Methods:** VEGF

expression was evaluated by immunohistochemistry in 45 adenocarcinoma specimens. Pathologic staging (pTNM), histological characteristics and survival were assessed using an ANOVA test, a multivariate analysis and the Kaplan-

Meier method. **Results:** A higher VEGF expression level was observed in stages IA and IB compared with II, III and IV ( $p < 0.001$ ). A lower VEGF expression level correlated with a greater tumor penetration level in the gastric wall ( $p < 0.003$ ) and the extent of tumor spread to the lymph nodes ( $p < 0.001$ ). Higher VEGF scores correlated with a longer survival time (HR 0.37; 95% CI: 0.17 - 0.79). **Conclusion:**

An inverse correlation was observed between VEGF expression and gastric tumor stage. A multivariate analysis demonstrates that VEGF expression is an independent prognostic factor for survival in gastric cancer.

**Keywords:** VEGF-A, Angiogenesis, Staging, Prognosis, Gastric cancer.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estimativa de novos casos de câncer gástrico para 2012 no RS .....	20
<b>Tabela 2</b> - Classificação T.....	24
<b>Tabela 3</b> - Classificação N.....	24
<b>Tabela 4</b> - Classificação M.....	24
<b>Tabela 5</b> - Estadiamento anátomo-patológico do câncer gástrico (pTNM) .....	25
<b>Tabela 6</b> - Estadiamento final TNM e componentes individuais.....	26
<b>Tabela 1 (artigo)</b> - Características clínico-patológicas da amostra .....	45
<b>Tabela 2 (artigo)</b> - Classificação de <i>Borrmann, Lauren</i> e diferenciação celular..	46
<b>Tabela 3 (artigo)</b> - Distribuição da amostra em relação a penetração do tumor .	46
<b>Tabela 4 (artigo)</b> - Associação do VEGF com estadiamento pT, pN e M .....	50
<b>Tabela 5 (artigo)</b> - Associação do VEGF com características histopatológicas e sobrevida.....	50
<b>Tabela 6 (artigo)</b> - Análise de sobrevida pelo modelo de regressão de Cox com análise uni e multivariável .....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estimativa regional de câncer gástrico para 2012 no Brasil. ....	19
<b>Figura 2:</b> Classificação do câncer gástrico. ....	22
<b>Figura 3:</b> Estadiamento do câncer gástrico. ....	22
<b>Figura 4:</b> Cirurgia do câncer gástrico conforme localização tumoral. ....	26
<b>Figura 5:</b> Representação cristalográfica da molécula do VEGF-A.....	29
<b>Figura 6:</b> Gatilho angiogênico e crescimento tumoral.....	31
<b>Figura 1 (artigo):</b> Distribuição total da amostra por frequência de estadiamento pTNM. ....	47
<b>Figura 2 (artigo):</b> Fotomicrografia de adenocarcinoma gástrico em aumento de 400 X.....	48
<b>Figura 3 (artigo):</b> Associação entre expressão do VEGF e estadiamento TNM patológico.....	49
<b>Figura 4 (artigo):</b> Relação microdensidade vascular com estadiamento TNM patológico.....	52
<b>Figura 5 (artigo):</b> Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global. ....	53
<b>Figura 6 (artigo):</b> Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de acordo com a expressão do VEGF.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b><math>\alpha</math>-IFN</b>	Interferon alfa
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>bFGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico básico
<b>CDH1</b>	Gene Caderina 1
<b>CG</b>	Câncer gástrico
<b>Cm</b>	Centímetros
<b><i>Cutt off</i></b>	Ponto de corte
<b>DAB</b>	Diaminoazobenzidina
<b>DMV</b>	Densidade microvascular
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonuclêico
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>FT</b>	Fator tecidual
<b>HC</b>	Hospital de Clínicas
<b>HIF</b>	Fator induzido por hipóxia
<b>HLS</b>	Hospital São Lucas
<b>HR</b>	<i>Hazard Ratio</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IHQ</b>	Imunoistoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetase induzível
<b>MDV</b>	Microdensidade vascular
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetros quadrados
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>p53</b>	Gene p53
<b>PF4</b>	Fator plaquetário 4
<b>pTNM</b>	Estadiamento patológico
<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TAF</b>	Fator de angiogênese tumoral
<b>TGF <math>\beta</math></b>	Fator de transformação de crescimento beta
<b>TIMP</b>	Inibidor de metaloproteinase
<b>pTNM</b>	Classificação patológica dos tumores malignos
<b>TP</b>	Timidina Fosforilase
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>UICC</b>	União Internacional contra o Câncer
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VEGFR-1</b>	Receptor tipo 1 do VEGF
<b>VEGFR-2</b>	Receptor tipo 2 do VEGF
<b>VEGFR-3</b>	Receptor tipo 3 do VEGF

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO .....	19
2.2 CARACTERÍSTICA ANÁTOMO-PATOLÓGICA DO CÂNCER GÁSTRICO ..	21
2.3 ESTADIAMENTO DO CÂNCER GÁSTRICO .....	23
2.3.1 Estadiamento TNM no câncer gástrico.....	25
2.4 TRATAMENTO DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO .....	26
2.5 FATOR CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E ANGIOGÊNESE....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (REVISÃO)</b> .....	33
<b>5 ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO</b> .....	39
5.1 ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	40
Estadiamento e sobrevida no câncer gástrico papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	40
<b>Resumo</b> .....	40
<b>Introdução</b> .....	41
<b>Material e Métodos</b> .....	42
<i>Dados da amostra e estadiamento do câncer gástrico</i> .....	42
<i>VEGF e avaliação imunoistoquímica</i> .....	43

<i>Microdensidade vascular</i> .....	43
<i>Análise estatística</i> .....	44
<b>Resultados</b> .....	44
<i>Dados clínico-patológicos da amostra</i> .....	44
<i>Expressão imunoistoquímica do VEGF</i> .....	47
<i>Relação da expressão do VEGF e estadiamento</i> .....	48
<i>Densidade microvascular e estadiamento</i> .....	52
<i>Análise de sobrevida global</i> .....	53
<i>Relação da sobrevida com a expressão do VEGF</i> .....	54
<b>Discussão</b> .....	55
<b>Conclusão</b> .....	60
<b>Referências</b> .....	61
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64
<b>ANEXOS</b> .....	65
ANEXO A – Artigo submetido à publicação (versão inglês) .....	66
ANEXO B - Certificado de tradução .....	98
ANEXO C – Carta de submissão do artigo.....	99
ANEXO D - Produção científica durante a vigência do mestrado.....	99

## 1 INTRODUÇÃO

---

A angiogênese é o termo utilizado para descrever o processo de crescimento de novos vasos sanguíneos. Está fisiologicamente presente durante a fase embrionária e fetal. No adulto é usualmente ausente, restringindo-se a poucas situações onde representa uma etapa essencial, como na reprodução e cicatrização (1). Nestas situações a angiogênese é um processo ordenado e autolimitado, resultado do equilíbrio entre fatores estimuladores e inibidores da proliferação vascular. Quando a multiplicação vascular aumenta, a angiogênese persistente e não controlada, torna-se patológica e sustenta a progressão de muitas doenças neoplásicas e não-neoplásicas. A angiogênese associada a tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro, garantindo perfusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos (2).

A idéia do crescimento tumoral dependente da neovascularização originou-se no início dos anos 60, a partir de experimentos *in vitro* onde células tumorais foram inoculadas em órgãos perfundidos isolados (3). A completa ausência de angiogênese, devido a artefatos de perfusão, resultou em restrição do crescimento tumoral até o diâmetro máximo de 2 a 3 mm, sendo interrompido seu crescimento e passando a um estado quiescente, porém viável. Quando estes pequenos tumores foram transferidos à mesma linhagem do camundongo, do

qual se originaram, desenvolveram neovascularização e cresceram acima de 1000 vezes com relação ao seu tamanho prévio. A partir destes experimentos, a hipótese proposta foi de que células endoteliais poderiam limitar a expansão tumoral e sem neovascularização, a maioria dos tumores sólidos interromperia seu crescimento ao atingir o diâmetro aproximado de 2 a 3 mm (4, 5). Folkman *et al.*, isolaram um fator em tumores humanos e animais denominado *tumor-angiogenesis factor* (TAF) que demonstrou atividade mitogênica celular, estimulando a rápida formação de novos capilares em experimentos com animais (6). A partir do isolamento do TAF e baseando-se em suas observações anteriores, Folkman descreveu pioneiramente, que a angiogênese é um pré-requisito para o crescimento tumoral e não simplesmente um efeito colateral deste, estabelecendo a hipótese de que o crescimento tumoral é angiogênese-dependente: “uma vez que o tumor tenha ocorrido, cada aumento na população celular deve ser precedido pela proliferação de novos vasos capilares, convergindo ao tumor”. Após a identificação do TAF, uma série de reguladores positivos da angiogênese começaram a ser identificados (7). Dentre eles, os mais estudados em tumores humanos, são o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Durante a atividade angiogênica, uma ou mais destas proteínas são liberadas pelas células tumorais, difundindo-se através dos tecidos e, alcançando a rede vascular do hospedeiro, desencadeando uma sequência de eventos, tais como: degradação da membrana basal, protusão e migração celular endotelial em direção ao estímulo angiogênico, formação de colunas e alças capilares através da intensa proliferação celular, seguida de canalização e perfusão sanguínea (1, 2). Porém, as células tumorais

não são a única fonte destas proteínas no estroma tumoral. O tumor pode recrutar macrófagos, os quais produzem suas próprias proteínas angiogênicas. Os mastócitos também são recrutados, e repletos com heparina, ampliam o efeito do bFGF. Além das proteínas angiogênicas liberadas pelas células tumorais, o bFGF, armazenado na matriz extracelular, também é mobilizado por collagenases ou heparinases. Porém, a liberação desses fatores de crescimento, isoladamente, não é o suficiente para o início da atividade angiogênica tumoral. O estímulo angiogênico deve ser acompanhado da supressão dos inibidores locais da angiogênese – os reguladores negativos – que protegem o endotélio vascular do estímulo proliferativo (8). Diversas proteínas na circulação inibem a proliferação celular endotelial, incluindo o fator plaquetário 4 (PF<sub>4</sub>), thrombospondin-1, fator de transformação do crescimento beta TGF- $\beta$ , inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3), Interferon alfa ( $\alpha$ -IFN), prolactina (fragmento 16-Kd) e angiostatina (fragmento 38-Kd do plasminogênio).

A atividade angiogênica em um determinado tumor é um processo complexo, sendo determinada pela quebra no equilíbrio local entre os reguladores positivos e negativos da proliferação microvascular, na qual os negativos são suprimidos.

O papel da angiogênese como fator prognóstico, somente foi reconhecido a partir do relato de Weidner *et al.*, (1991) que, além de investigarem a angiogênese em carcinoma de mama, introduziram a metodologia de contagem microvascular (9). Desde os resultados promissores desta publicação, o papel da angiogênese tem sido extensamente investigado e ampliado a praticamente todos os tumores sólidos humanos (10). O número de estudos que determinam a angiogênese



como fator prognóstico em tumores de mama, pulmão, trato gastrointestinal, geniturinário e pele superam amplamente aqueles que não encontraram tal associação (11-13).

Os microvasos intratumorais são identificados através de imunoistoquímica em secções histológicas tumorais com parafina e sua contagem é feita por visualização através de análise computadorizada em aumento de 200 vezes – através desse método é possível calcular a densidade de microvasos. Diversos marcadores endoteliais são disponíveis: Anti-CD31, Anti-FVIII, Anti-CD34, Anti-CD36, PAL-E, BMA120-BW200 e EM-4. Embora o melhor marcador para avaliação angiogênica não tenha ainda sido estabelecido, o anti-CD34 tem demonstrado ser superior em secções com parafina (14).

No trato gastrointestinal, a imunoistoquímica tem propiciado achados importantes na angiogênese em tumores de diferentes estadiamentos (15).

Cavazzola em 2003 (16), estudou a expressão do VEGF em tumores de esôfago e Toneto em 2006 (17), a microdensidade vascular (MDV) em tumores gástricos, não sendo observado nos dois estudos relação do VEGF e MDV com a sobrevida.

Fillmann em 2006 (18), observou associação positiva da MDV e expressão imunoistoquímica do fator tecidual (FT) em amostra de tumores de cólon, sendo a MDV maior e o TF mais expresso nos pacientes com média de idade mais avançada ( $60,2 \pm 11,5$  vs  $42,6 \pm 10,2$ ;  $p < 0,01$ ).

Uma meta-análise publicada em 2011 correlacionou a expressão imunoistoquímica do VEGF com a sobrevida e fatores prognósticos no câncer gástrico (19). Foi observada pior sobrevida em pacientes que expressavam mais

intensamente o VEGF e associação com fatores de pior prognóstico como invasão de parede gástrica, presença de metástases linfonodais e estadiamento avançado. O VEGF demonstrou estar relacionado à angiogênese do câncer gástrico e a promoção do seu crescimento.

Em estudo realizado por Feng *et al.*, (2002) utilizando método imunohistoquímico para avaliação da angiogênese em neoplasias gástricas, a expressão aumentada de VEGF e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) foi bem correlacionada com a classificação TNM, sendo o p53 mais presente nos tumores menos diferenciados em comparação com os bem diferenciados. Neste estudo não houve relação com a profundidade de invasão da parede gástrica (20). Posteriormente em trabalho realizado em 2005 por Yamaguchi *et al.*, observou-se que o p53, o VEGF e a iNOS podem ser responsáveis pela carcinogênese gástrica e pela agressividade dos tumores (21). Koide *et al.*, (2002) relataram o uso da imunohistoquímica para a avaliação de proliferação celular em pacientes com metástase hepática de câncer gástrico (22). O índice de proliferação medido pelo Ki-67 foi 43,2% no tumor primário, 39,9% na metástase sincrônica e aumentou nas metástases metacrônicas ressecadas. Comportamento semelhante ocorreu com índice apoptótico e densidade de microvasos tumorais. Através do efeito na proliferação, da apoptose e da angiogênese ficou indicado pelo estudo que o crescimento do tumor em metástases hepáticas sincrônicas é menos vigoroso que em metástases metacrônicas (22).

Tumores gástricos localmente avançados inoperáveis também foram investigados em relação a densidade dos microvasos tumorais, expressão do p53 e do VEGF, demonstrando que a expressão do p53 parece estar relacionada à

densidade de microvasos (23). A densidade de microvasos, por sua vez, se mostrou associada ao pior prognóstico. Os dados encontrados frente aos marcadores citados tornou possível aos autores postularem que a utilização dos ensaios imunohistoquímicos permitiria a divisão de até 80% dos tumores gástricos em categorias, o que é útil para novas estratégias terapêuticas envolvendo drogas e estudos em fase III (23) .

Agentes anti-angiogênicos utilizados de maneira isolada ou em combinação com terapias convencionais já estão em estudo em diversos tipos de câncer (24-27). Estes ensaios são baseados em estratégias que interferem diretamente na vascularização tumoral atuando em receptores, na transdução e sinalização de moléculas envolvidas na angiogênese.

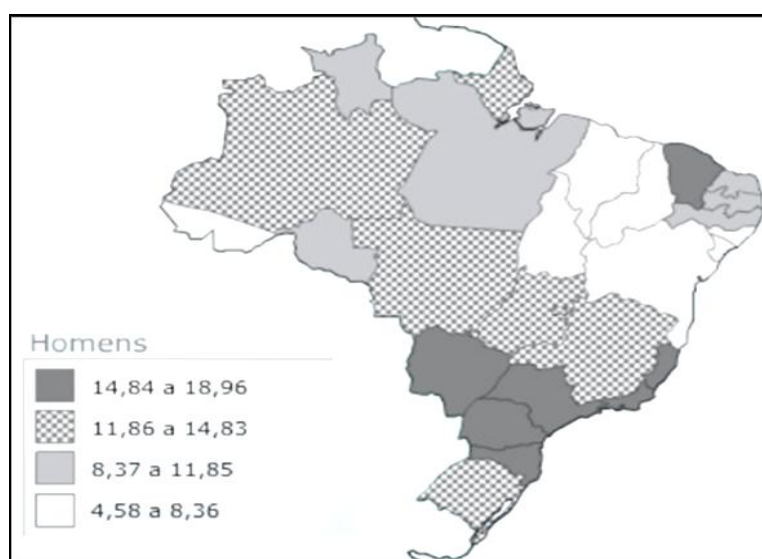
A expressão da proteína VEGF pode representar um marcador de prognóstico poderoso, ajudando na identificação de pacientes de alto risco e auxiliando na tomada de decisão sobre o tratamento, além de ser alvo potencial no bloqueio da angiogênese e progressão do câncer gástrico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico vem apresentando declínio importante em incidência e mortalidade nos últimos 70 anos. Apesar da diminuição, ainda permanece como o quarto câncer mais prevalente e segunda causa de morte por neoplasia no mundo (28). Apresenta maior frequência nos homens (2:1), principalmente após a sexta década de vida. No Japão são encontradas as maiores taxas de câncer gástrico com 100 casos por 100.000 habitantes (29,30). No Brasil as taxas de câncer gástrico diferem conforme as regiões, sendo estimados para 2012 de 11,86 a 14,83 casos por 100.000 habitantes homens na região Sul. (Figura 1) (31).



**Figura 1:** Estimativa regional de câncer gástrico para 2012 no Brasil. (Incidência por 100.000/hab. homens).

**Fonte:** Instituto Nacional do Câncer (INCA).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), considerando a população masculina, em 2012 o Rio Grande do Sul terá 760 novos casos de câncer gástrico com taxa de 14,9/100.000 habitantes e Porto Alegre 100 novos casos com taxa bruta de 15,4/100.000, conforme descrito na Tabela 1 (31).

**Tabela 1** - Estimativa de novos casos de câncer gástrico para 2012 no RS

Local	Novos casos	Taxa Bruta por 100.000 Hab
Rio Grande do Sul	760	14,9
Porto Alegre / RS	100	15,4

Taxas brutas de incidência por 100.000/ hab. homens. RS: Rio Grande do Sul  
**Fonte:** Instituto Nacional do câncer (INCA).

A etiologia do câncer gástrico é multifatorial com marcada variação geográfica sugerindo fatores ambientais relacionados ao estilo de vida. A ingestão de alimentos preservados no sal e defumados são considerados fatores de risco (32). A infecção pelo *Helicobacter pilory* cria condições favoráveis para o surgimento do câncer pela indução de inflamação crônica, atrofia e metaplasia e aumenta em até seis vezes a chance de desenvolver a doença (33, 34). A participação da bactéria na gênese do câncer pode explicar a relação entre a diminuição mundial do número de casos de câncer de estômago e a melhor conservação dos alimentos, principalmente nos países desenvolvidos.

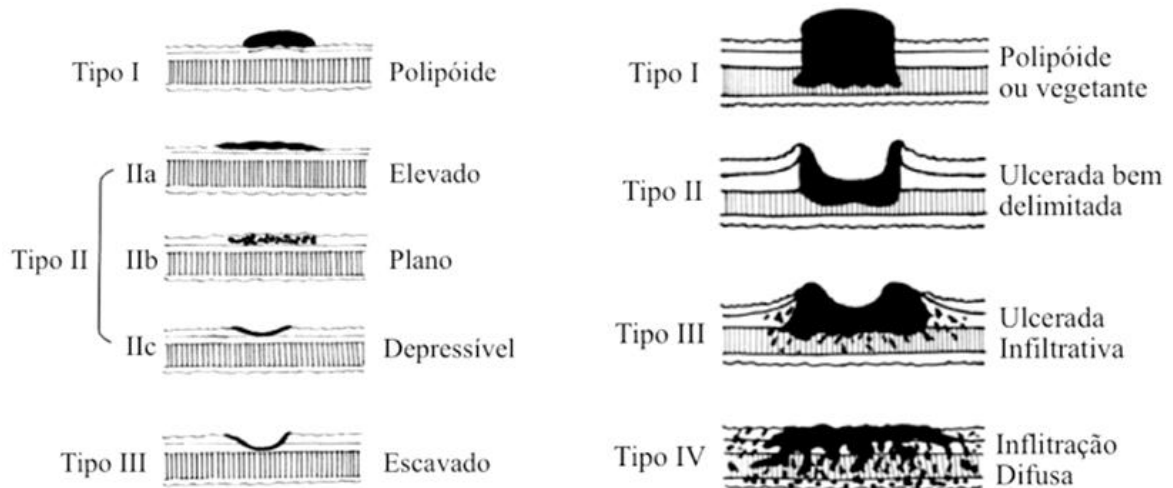
Pacientes gastrectomizados para tratamento de doença benigna gástrica ou duodenal têm um risco maior de desenvolver neoplasia no coto gástrico decorridos 15 anos de cirurgia, independente do tipo de reconstrução intestinal realizada (35). A antrectomia leva a diminuição da secreção cloridro-péptica, refluxo de secreção pancreática e biliar e por fim metaplasia intestinal.

O tabagismo é outro fator de risco associado ao câncer de estômago. Em recente estudo o risco relativo calculado em homens tabagistas foi de 1.98 (HR 1.98; 95% CI: 1.46-2.70) comparado com aqueles que nunca fumaram (36).

O rápido desenvolvimento tecnológico e melhor conhecimento da biologia molecular das neoplasias, proporcionou na última década, a identificação de diversas alterações genéticas relacionadas a carcinogênese. Apesar de alguns mecanismos moleculares ainda não estarem claros, alterações em proto-oncogênes e perda de função de genes supressores tumorais, são consideradas as principais causas do desenvolvimento neoplásico (37). Alterações nos proto-oncogênes estão usualmente associadas com amplificação, mutação e translocação enquanto alterações genéticas nos genes supressores estão relacionadas a deleção, mutação e metilação. Essas alterações são de grande utilidade como biomarcadores e têm aplicação clínica no diagnóstico, prognóstico e predição na resposta terapêutica do tratamento dos tumores sólidos (38).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS DO CÂNCER GÁSTRICO

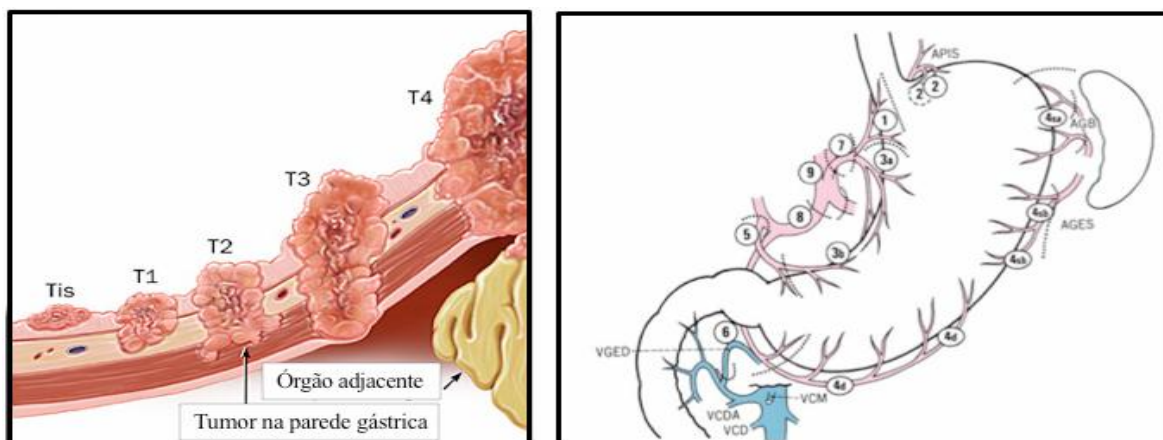
Os tumores malignos do estômago são na sua maioria (mais de 95%) adenocarcinomas (28). A Associação Japonesa do Câncer Gástrico desenvolveu uma classificação macroscópica derivada daquela descrita por Borrmann(39) e da proposta pela Sociedade Japonesa de Endoscopia(40), dividindo os tumores em superficiais (precoces) e avançados (Figura 2).



**Figura 2:** Classificação do câncer gástrico. Tipo superficial (esquerda) e tipo avançado (direita).

**Fonte:** Traduzido - Associação Japonesa do Câncer Gástrico (40).

O conceito do carcinoma gástrico precoce foi portanto, descrito pela primeira vez pela Sociedade Japonesa de Endoscopia. Os tumores considerados precoces estão restritos à mucosa e submucosa, sem penetração na camada muscular própria. Apresentam prognóstico favorável e melhor sobrevida em 5 anos quando comparados aos carcinomas avançados (41). (Figura 3).



**Figura 3:** Estadiamento do câncer gástrico. Componente T (penetração na parede gástrica) e N (comprometimento linfonodal).

**Fonte:** Johns Hopkins webpage / Associação Japonesa do Câncer Gástrico (40).

A classificação de *Lauren* divide os adenocarcinomas gástricos em dois tipos histológicos: tipo intestinal e difuso (42). Nakamura e colaboradores propuseram uma classificação baseada no grau histológico diferenciado e indiferenciado (43), na qual o tipo diferenciado apresenta formação de glândulas (adenocarcinoma tubular e papilar) e o indiferenciado pouca ou nenhuma formação glandular (anel de sinete). Desta maneira podem ser estratificados em bem diferenciados (G1) e indiferenciados (G4) com dois graus intermediários (G2 e G3). Os tumores indiferenciados estão associados com pior prognóstico quando comparado com outros tipos histológicos (44).

### 2.3 ESTADIAMENTO DO CÂNCER GÁSTRICO

O sistema de estadiamento do câncer gástrico já sofreu várias atualizações pela União Internacional Contra o Câncer (45, 46), sendo a 7ª edição descrita em 2010 (47). Seus componentes são representados pelas letras TNM: Onde T representa a penetração do tumor primário na parede gástrica (Tabela 2), a letra N representa a extensão de linfonodos na cadeia ganglionar (Tabela 3) e M a presença ou ausência de metástases à distância (Tabela 4)(47).



**Tabela 2 - Classificação T**

ESTÁGIO		DESCRIÇÃO
TX		Tumor primário não pode ser avaliado
T0		Sem evidência de tumor primário
Tis		Carcinoma <i>in situ</i> . Intra-epitelial sem invasão da lâmina própria
T1	T1a	Invasão da muscular da mucosa
	T1b	Invasão da submucosa
T2		Invasão da muscular própria
T3		Penetração da subserosa sem invasão de peritônio visceral ou órgão adjacentes
T4	T4a	Invasão da serosa
	T4b	Invasão de órgãos adjacentes

Categoria T, representa penetração do tumor na parede gástrica.

**Fonte:** Classificação TNM no câncer gástrico 7ª ed., 2010 (47).

**Tabela 3 - Classificação N**

ESTÁGIO		DESCRIÇÃO
NX		Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0		Sem envolvimento linfonodal
N1		1-2 linfonodos invadidos
N2		3-6 linfonodos invadidos
		7 linfonodos invadidos
N3	N3a	7 a 15 linfonodos invadidos
	N3b	> 15 linfonodos invadidos

Categoria N, representa comprometimento linfonodal.

**Fonte:** Classificação TNM no câncer gástrico 7ª ed., 2010 (47).

**Tabela 4 - Classificação M**

ESTÁGIO	DESCRIÇÃO
M0	Sem metástases à distância
M1	Com metástases à distância

Categoria M, representa a presença ou ausência de metástase à distância.

**Fonte:** Classificação TNM no câncer gástrico 7ª ed., 2010 (47).

### 2.3.1 Estadiamento TNM no câncer gástrico

Quando agrupadas as categorias T, N e M em combinações pré-estabelecidas, o estadiamento final será obtido (Tabela 5 e 6). Pode ser dividido em estadiamento clínico e patológico. O estadiamento clínico é determinado com dados de exame físico e exames complementares. O estadiamento patológico baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomo-patológico da peça operatória, determinando a extensão da doença com maior precisão. O estadiamento implica em prognóstico e resposta terapêutica semelhante nos tumores com a mesma classificação histopatológica e extensão da doença.

**Tabela 5** - Estadiamento anatomo-patológico do câncer gástrico (pTNM)

<b>ESTADIAMENTO</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Estádio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estádio IA</b>	T1	N0	M0
<b>Estádio IB</b>	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
<b>Estádio IIA</b>	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
<b>Estádio IIB</b>	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
<b>Estádio IIIA</b>	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
<b>Estádio IIIB</b>	T4b	N0 ou N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
<b>Estádio IIIC</b>	T4b	N2 ou N3	M0
	T4a	N3	M0
<b>Estádio IV</b>	qualquer T	qualquer N	M1

**Fonte:** Classificação TNM no câncer gástrico 7ª ed., 2010 (47).

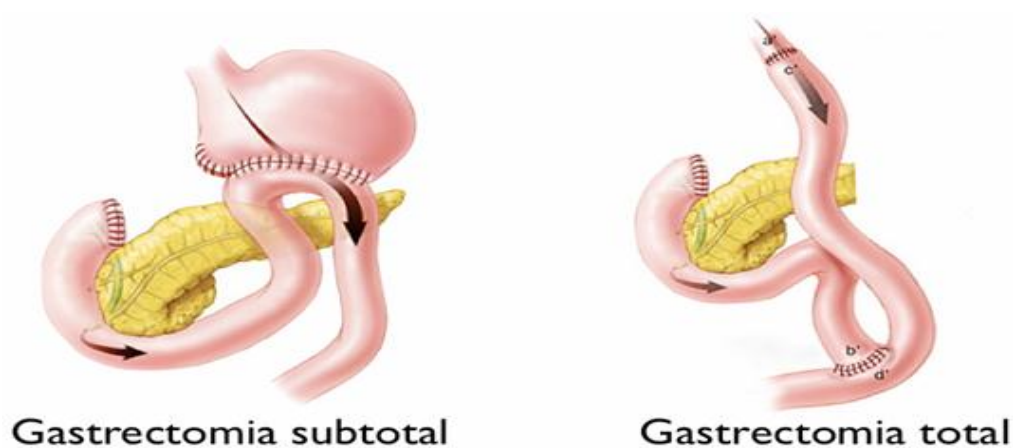
**Tabela 6** - Estadiamento final TNM e componentes individuais

	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
T1a (mucosa), T1b (submucosa)	IA	IB	IIA	IIB
T2 Muscular própria	IB	IIA	IIB	IIIA
T3 Subserosa	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T4a Invasão serosa	IIIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4b Invasão órgãos adjacentes	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC
M1 Metástase à distância (QqT, QqN)			IV	

**Fonte:** Traduzido e adaptado do *AJCC Cancer Staging Manual* (46).

## 2.4 TRATAMENTO DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

O tratamento do câncer de estômago com objetivo de cura compreende desde a ressecção endoscópica em tumores precoces restritos à mucosa até a gastrectomia total com margem de segurança, englobando o grande epíloon e cadeias linfonodais regionais (Figura 4).



**Figura 4:** Cirurgia do câncer gástrico conforme localização tumoral.

**Fonte:** Site Johns Hopkins, Gastroenterology and Hepatology.

Em estágios iniciais quando a neoplasia está restrita à mucosa sem invasão da lâmina própria, o tratamento poderá ser feito com a ressecção endoscópica. Uma invasão tumoral clinicamente confinada à mucosa com tamanho igual ou menor que 2cm e com histologia bem diferenciada, constituem indicações para ressecção endoscópica curativa propostas pela Associação Japonesa de Câncer Gástrico (48).

A cirurgia no câncer gástrico depende principalmente de fatores como localização do tumor e tipo histológico. A gastrectomia total deverá ser a escolha nas neoplasias localizadas nos dois terços proximais do estômago ou naquelas classificadas como tipo difuso. Lesões histológicas do tipo intestinal localizadas no terço distal do estômago, podem ser tratadas por gastrectomias subtotais com margem cirúrgica proximal de 5cm e distal de pelo menos 2 a 3 cm (49). A ressecção linfonodal faz parte do tratamento cirúrgico e deve ser realizada junto com a ressecção gástrica. Pode ser restrita a gânglios linfáticos próximos ao tumor (3cm), chamada D1, ou mais extensa, classificada como D2 englobando linfonodos da bolsa omental, tronco celíaco retroduodenais, hepatoduodenais, esplênicos além da realização de esplenectomia e pancreatectomia distal. A ressecção do tipo D2 por ser mais extensa está associada com maior morbidade e mortalidade peri-operatória, demonstrando em alguns estudos, benefício na sobrevida em 5 anos em pacientes com estágio T3/T4 com preservação esplênica e pancreática (50).

Nos pacientes em estadiamento IV apresentando doença avançada com invasão de órgãos à distância, a abordagem cirúrgica é apenas paliativa e visa corrigir complicações como obstrução ou sangramentos. Neste grupo de

pacientes, a quimioterapia pode melhorar a sobrevida e controlar sintomas. Os agentes mais utilizados são o 5-FU e cisplatina. Novas drogas como o Paclitaxel, Docetaxel, Irinotecano e S1 (pró-fármaco do 5-FU) estão sendo utilizadas em ensaios clínicos com melhores resultados quando utilizados em associação (51).

A radioterapia pode ser utilizada de forma isolada ou associada a quimioterapia como tratamento adjuvante em tumores localmente avançados. Apesar de não apresentar melhora significativa na sobrevida, parece estar relacionada a melhor controle loco-regional e tempo livre da doença (52).

A terapia monoclonal utilizando anticorpos contra alvos biológicos representa nova estratégia contra as neoplasias gástricas (53). O Bevacizumab atua contra o VEGF, quando utilizado em conjunto com agentes quimioterápicos convencionais demonstra melhora na sobrevida na comparação com placebo e quimioterapia (54). Outros estudos em fase III, utilizando Cetuximab como terapia combinada à quimioterapia em pacientes com câncer gástrico metastático, identificaram melhora na sobrevida e diminuição do tempo de progressão da doença (55). O tratamento do câncer gástrico está mudando de maneira rápida. Os melhores resultados são obtidos com cirurgia radical e terapia neoadjuvante pré ou pós-operatórias. Diversos estudos clínicos estão em andamento utilizando novas drogas citotóxicas e terapias com agentes monoclonais. Os avanços no entendimento da carcinogênese e seus mecanismos moleculares permitirão no futuro, customizar a terapêutica adaptando às características individuais de cada paciente e às diversas apresentações do câncer gástrico.

## 2.5 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E ANGIOGÊNESE

O VEGF é um dímero protéico formado pela interação de duas proteínas, sinalizadoras com ação autócrina e parácrina (Figura 5). Essas proteínas ativam receptores trans-membrana localizados em células endoteliais e exercem potente ação proliferativa nas células do endotélio vascular. Em humanos, foram identificados seis sub-tipos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e P1GF (*Placental Growth Factor*), sendo o VEGF-A (chamado apenas de VEGF), o mais ativo no processo da angiogênese (56) .



**Figura 5:** Representação cristalográfica da molécula do VEGF-A.

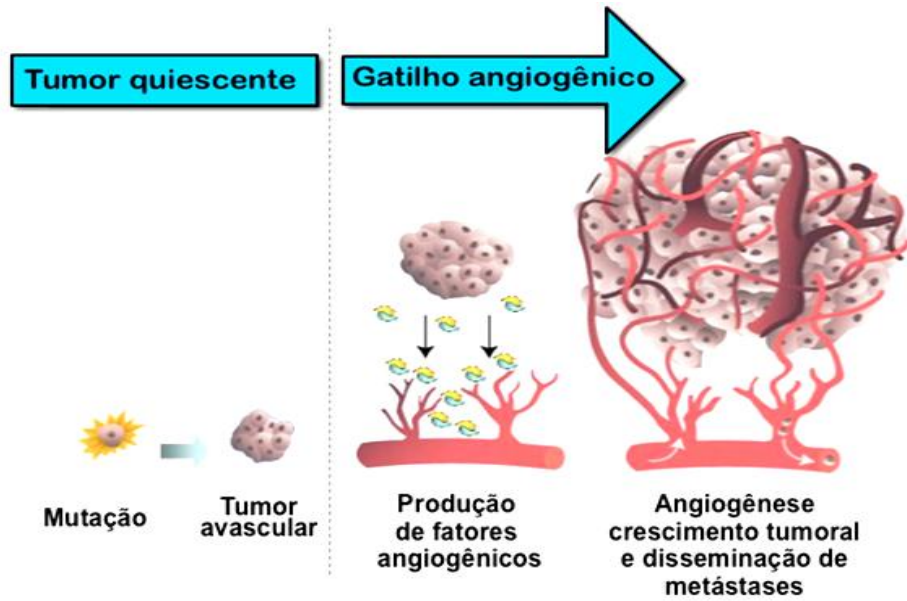
**Fonte:** PyMOL *Molecular Visualization System Open source Foundation*.

Em situações de hipóxia, o VEGF promove intensa proliferação celular, aumento da permeabilidade vascular e inibição da apoptose, induzindo a angiogênese (57). Desempenha desta maneira, papel importante no desenvolvimento de tumores sólidos e formação de metástases. Liga-se a receptores tirosina quinase (VEGFR-1 e VEGFR-2) e sua expressão tecidual pode ser avaliada por técnica de imunistoquímica (58).

A angiogênese envolve processos de divisão celular, degradação seletiva

da membrana basal e do ambiente da matriz extracelular seguida por migração de células endoteliais com formação de uma nova estrutura tubular. Essas etapas são reguladas por um complexo sistema de controle com fatores pró e anti-angiogênicos que mantêm em equilíbrio os sinais de estímulo e inibição do crescimento dos vasos sanguíneos. A progressão de várias patologias como crescimento de tumores, psoríase, artrite reumatóide e retinopatia diabética, está diretamente relacionada ao aumento anormal das redes vasculares (59).

O tumores sólidos expressam níveis elevados de VEGF quando comparados a tecidos normais. De acordo com Hanahan e colaboradores, o alto nível de VEGF está relacionado a hipóxia e ativação de oncogênes durante o crescimento tumoral (60). O chamado "gatilho angiogênico" (*angiogenic switch*) é etapa fundamental na progressão dos tumores sólidos (Figura 6). Ocorre no momento em que pequenos nódulos neoplásicos em estado quiescente iniciam seu crescimento supridos por uma nova rede vascular que garante o aporte de oxigênio e nutrientes (61). Vários fatores são responsáveis pelo "gatilho angiogênico", dentre eles o estresse metabólico (hipóxia, hipoglicemia e baixo pH), estresse mecânico (aumento da pressão local pela proliferação celular), respostas inflamatórias e ativação de oncogênes(62).



**Figura 6:** Gatilho angiogênico e crescimento tumoral.

**Fonte:** Adaptado de Bergers e Benjamin (62).

Os processos de regulação da angiogênese são bastante complexos e ainda não estão completamente elucidados, porém nas últimas décadas a descoberta de novos fatores e rotas moleculares trouxeram avanços significativos no conhecimento destes mecanismos.



### **3 OBJETIVOS**

---

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão imunoistoquímica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) na angiogênese do câncer gástrico, correlacionando com estadiamento da doença e sobrevida dos pacientes.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar os aspectos clínico-patológicos e o comportamento biológico na amostra de tumores gástricos selecionadas;
- Avaliar quantitativamente a expressão imunoistoquímica do antígeno VEGF correlacionando com a microdensidade vascular na amostra em estudo;
- Investigar a existência de associações entre os índices de expressão tecidual do VEGF com fatores prognósticos e sobrevida;
- Determinar a validade da imunoistoquímica do VEGF na angiogênese do câncer gástrico na amostra estudada;
- Determinar se a quantificação da angiogênese utilizando a expressão do VEGF acrescenta informações à avaliação do estadiamento e sobrevida dos pacientes com câncer gástrico.

#### **4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (REVISÃO)**

---

1. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood cells, molecules & diseases*. 2007;39(2):212-20. Epub 2007/06/08.
2. Benedetta Donati M, Gozdzikiewicz J. Angiogenesis and the progress of vascular and tumor biology: a tribute to Judah Folkman. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;99(4):647-50. Epub 2008/04/09.
3. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Annals of surgery*. 1966;164(3):491-502. Epub 1966/09/01.
4. Gimbrone MA, Jr., Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature*. 1969;222(5188):33-6. Epub 1969/04/05.
5. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6. Epub 1971/11/18.
6. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 1971;133(2):275-88. Epub 1971/02/01.
7. Pepper MS. Positive and negative regulation of angiogenesis: from cell biology to the clinic. *Vasc Med*. 1996;1(4):259-66. Epub 1996/01/01.
8. Itoh S, Itoh F. Inhibitory machinery for the TGF-beta family signaling pathway. *Growth Factors*. 2011;29(5):163-73. Epub 2011/09/15.
9. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1991;324(1):1-8. Epub 1991/01/03.
10. Berz D, Wanebo H. Targeting the growth factors and angiogenesis pathways: small molecules in solid tumors. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(6):574-86. Epub 2011/04/12.
11. Sharma SG, Aggarwal N, Gupta SD, Singh MK, Gupta R, Dinda AK. Angiogenesis in renal cell carcinoma: correlation of microvessel density and

microvessel area with other prognostic factors. *International urology and nephrology*. 2011;43(1):125-9. Epub 2010/06/11.

12. Salgia R. Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011;117(17):3889-99. Epub 2011/08/23.

13. Rykala J, Przybylowska K, Majsterek I, Pasz-Walczak G, Sygut A, Dziki A, et al. Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. *Pathology oncology research : POR*. 2011;17(4):809-17. Epub 2011/05/12.

14. Yilmazer D, Han U, Onal B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. *International urology and nephrology*. 2007;39(3):691-8. Epub 2006/12/21.

15. Iordache S, Saftoiu A, Georgescu CV, Ramboiu S, Gheonea DI, Filip M, et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel density--two useful tools for the assessment of prognosis and survival in gastric cancer patients. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*. 2010;19(2):135-9. Epub 2010/07/02.

16. Cavazzola LT. Avaliação da proteína p53 e do VEGF(Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago (Tese).Porto Alegre: Faculdade de Medicina: Universidade Federal do Rio Grande do Sul ; 2003.

17. Toneto MG. Análise imunoistoquímica da expressão do Fator Tecidual e da Densidade Microvascular no câncer gástrico: Correlação com fatores prognósticos e sobrevida (Tese).Porto Alegre: Faculdade de Medicina PUCRS; 2006.

18. Fillmann LS. A expressão do Fator Tecidual no adenocarcinoma colo-Retal: relação com aspectos clínico-patológicos (Tese).Porto Alegre: Faculdade de Medicina: PUCRS; 2006.

19. Chen J, Li T, Wu Y, He L, Zhang L, Shi T, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma: a meta-analysis. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(12):1799-812. Epub 2011/09/16.

20. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC cancer*. 2002;2:8. Epub 2002/04/30.

21. Yamaguchi K, Saito H, Oro S, Tatebe S, Ikeguchi M, Tsujitani S. Expression of inducible nitric oxide synthase is significantly correlated with expression of vascular endothelial growth factor and dendritic cell infiltration in

patients with advanced gastric carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):471-8. Epub 2005/07/16.

22. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Shimada K, Shimozawa N, Hanazaki K, et al. Cell proliferation, apoptosis and angiogenesis in gastric cancer and its hepatic metastases. *Hepato-gastroenterology*. 2002;49(45):869-73. Epub 2002/06/18.

23. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, Kapsoritakis A, Paspatis G, Kakolyris S, et al. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncology research*. 2000;12(1):33-41. Epub 2000/11/04.

24. Young R, Reed M. *Anti-angiogenic Therapy: Concept to Clinic. Microcirculation*. 2011. Epub 2011/11/15.

25. Henkin J, Volpert OV. Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15(12):1369-86. Epub 2011/12/06.

26. Falanga A, Marchetti M. Anticancer treatment and thrombosis. *Thrombosis research*. 2011. Epub 2011/11/29.

27. Bikfalvi A, Moenner M, Javerzat S, North S, Hagedorn M. Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochemical Society transactions*. 2011;39(6):1560-4. Epub 2011/11/23.

28. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol*. 2009;472:467-77. Epub 2008/12/25.

29. Lin Y, Ueda J, Kikuchi S, Totsuka Y, Wei WQ, Qiao YL, et al. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(39):4421-8. Epub 2011/11/24.

30. Trend in gastric cancer: 35 years of surgical experience in Japan. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(29):3390-7. Epub 2011/08/31.

31. INCA. Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2012. Capturado da Internet em 10/11/2011. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>.

32. Wang XQ, Terry PD, Yan H. Review of salt consumption and stomach cancer risk: epidemiological and biological evidence. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(18):2204-13. Epub 2009/05/14.

33. Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2009;12(2):79-87. Epub 2009/06/30.

34. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2006;57 Suppl 3:51-65. Epub 2006/10/13.
35. Adamu MA, Weck MN, Rothenbacher D, Brenner H. Incidence and risk factors for the development of chronic atrophic gastritis: five year follow-up of a population-based cohort study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;128(7):1652-8. Epub 2010/05/27.
36. Nomura AM, Wilkens LR, Henderson BE, Epplen M, Kolonel LN. The association of cigarette smoking with gastric cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer causes & control : CCC*. 2012;23(1):51-8. Epub 2011/11/01.
37. Imianitov EN. [Molecular diagnosis in oncology]. *Molekuliarnaia biologija*. 2008;42(5):772-85. Epub 2008/11/08.
38. Mountzios G, Sanoudou D, Syrigos KN. Clinical pharmacogenetics in oncology: the paradigm of molecular targeted therapies. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(20):2184-93. Epub 2010/05/13.
39. Li C, Oh SJ, Kim S, Hyung WJ, Yan M, Zhu ZG, et al. Macroscopic Borrmann type as a simple prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Oncology*. 2009;77(3-4):197-204. Epub 2009/09/05.
40. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2011;14(2):101-12. Epub 2011/05/17.
41. Kim BS, Cho SW, Min SK, Lee BH. Differences in prognostic factors between early and advanced gastric cancer. *Hepato-gastroenterology*. 2011;58(107-108):1032-40. Epub 2011/08/13.
42. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1965;64:31-49. Epub 1965/01/01.
43. Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gann = Gan*. 1968;59(3):251-8. Epub 1968/06/01.
44. Hass HG, Smith U, Jager C, Schaffer M, Wellhausser U, Hehr T, et al. Signet Ring Cell Carcinoma of the Stomach Is Significantly Associated with Poor Prognosis and Diffuse Gastric Cancer (Lauren's): Single-Center Experience of 160 Cases. *Onkologie*. 2011;34(12):682-6. Epub 2011/12/14.
45. Morelli D, Lazzerini D, Cazzaniga S, Squicciarini P, Bignami P, Maier JA, et al. Evaluation of the balance between angiogenic and antiangiogenic circulating factors in patients with breast and gastrointestinal cancers. *Clinical cancer*

research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 1998;4(5):1221-5. Epub 1998/06/02.

46. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(12):3077-9. Epub 2010/10/01.

47. Sobin L, Gospodarowicz, M; Wittekind, C TNM Classification of Malignant Tumors / UICC International Union Against Cancer. 2010(7th Edition):328.

48. Takeuchi Y, Iishi H, Uedo N, Higashino K, Ishihara R, Tatsuta M. [Endoscopic resection for early gastric cancer--JGCA gastric cancer treatment guidelines and indications for endoscopic resection]. *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastro-enterology*. 2008;105(3):344-50. Epub 2008/03/12.

49. Saka M, Morita S, Fukagawa T, Katai H. Present and future status of gastric cancer surgery. *Japanese journal of clinical oncology*. 2011;41(3):307-13. Epub 2011/01/19.

50. Seevaratnam R, Bocicariu A, Cardoso R, Mahar A, Kiss A, Helyer L, et al. A meta-analysis of D1 versus D2 lymph node dissection. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2011. Epub 2011/12/06.

51. Higuchi K, Tanabe S, Azuma M, Sasaki T, Ishido K, Koizumi W. Future perspectives for the development of chemotherapy for advanced gastric cancer: Japanese and global status. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2011;78(6):334-42. Epub 2011/11/23.

52. Orhan O, Eroglu C, Kaplan B, Ucar K, Altinbas M, Ozkan M, et al. Whole abdominal field versus standard field radiotherapy plus concomitant and adjuvant chemotherapy for patients with locally advanced gastric cancer. *Journal of radiation research*. 2011;52(2):168-75. Epub 2011/02/24.

53. Vecchione L, Orditura M, Ciardiello F, De Vita F. Novel investigational drugs for gastric cancer. *Expert opinion on investigational drugs*. 2009;18(7):945-55. Epub 2009/05/27.

54. Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park SR, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(30):3968-76. Epub 2011/08/17.

55. Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *British journal of cancer*. 2010;102(3):500-5. Epub 2010/01/14.

56. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):505-15. Epub 2000/02/26.
57. Coma S, Shimizu A, Klagsbrun M. Hypoxia induces tumor and endothelial cell migration in a semaphorin 3F- and VEGF-dependent manner via transcriptional repression of their common receptor neuropilin 2. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(3):266-75. Epub 2011/05/26.
58. Kafousi M, Vrekoussis T, Tsenteliero E, Pavlakis K, Navrozoglou I, Dousias V, et al. Immunohistochemical Study of the Angiogenetic Network of VEGF, HIF1alpha, VEGFR-2 and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Human Breast Cancer. *Pathology oncology research : POR*. 2012;18(1):33-41. Epub 2011/06/15.
59. Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, Kangave D, Siddiquei MM, Ola MS, Opendakker G. Angiogenesis regulatory factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta diabetologica*. 2011. Epub 2011/09/29.
60. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
61. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10. Epub 2005/11/23.
62. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):401-10. Epub 2003/06/05.

## 5 ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

---



Fator de impacto: 2,06



## 5.1 ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS

### ESTADIAMENTO E SOBREVIDA NO CÂNCER GÁSTRICO: PAPEL DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

Luciano Silveira Eifler<sup>1</sup>, Luiz Felipe Forgiarini<sup>2</sup>, Marcelo Garcia Toneto<sup>3</sup>, Norma Possa Marroni<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS

<sup>2</sup>Aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da UFRGS

<sup>3</sup>Professor do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da PUCRS

<sup>4</sup>Professora do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas e do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do HCPA da UFRGS

---

#### Resumo

**Introdução:** O VEGF é um dos principais promotores da angiogênese e demonstra relação com prognóstico no câncer gástrico. **Objetivos:** Correlacionar a expressão imunohistoquímica do VEGF com o estadiamento e sobrevida no câncer gástrico. **Métodos:** 45 espécimes de adenocarcinomas foram avaliados para expressão imunohistoquímica do VEGF. O estadiamento patológico (pTNM), características histológicas e sobrevida foram avaliados empregando os testes ANOVA, análise multivariada e curva de Kaplan-Meier. **Resultados:** Foi observada maior expressão do VEGF na comparação entre os estadiamentos IA e IB vs II,III e IV ( $p < 0,001$ ). O VEGF menos expresso estava relacionado com maior penetração do tumor na parede gástrica ( $p < 0,003$ ) e presença de comprometimento linfonodal ( $p < 0,001$ ). Pacientes apresentando tumores com maiores escores de VEGF tiveram maior sobrevida (HR 0,37; IC95%: 0,17-0,79). **Conclusão:** Houve associação inversa na expressão do VEGF com o estadiamento dos tumores gástricos. A análise multivariada demonstra a expressão do VEGF como fator prognóstico independente na sobrevida dos pacientes com câncer gástrico.

**Descritores:** VEGF-A, Angiogênese, Estadiamento, Prognóstico, Câncer gástrico.

## Introdução

A Angiogênese é o termo utilizado para descrever o processo de crescimento de novos vasos sanguíneos. Está fisiologicamente presente durante a fase embrionária e fetal. No adulto, é usualmente ausente, restringindo-se a poucas situações onde representa uma etapa essencial, como na reprodução e cicatrização (1). Nestas situações, a angiogênese é um processo ordenado e autolimitado, resultando do equilíbrio entre fatores estimuladores e inibidores. Quando a multiplicação vascular aumenta sem controle, a angiogênese torna-se patológica e sustenta a progressão de muitas doenças neoplásicas e não-neoplásicas.

A idéia do crescimento tumoral dependente da angiogênese, originou-se no início dos anos 60, através dos experimentos *in vitro* realizados por Folkman *et al.* (2). Passou a ser reconhecida como fator prognóstico a partir dos relatos de Weidner *et al.*, que estudaram a angiogênese em carcinoma de mama, introduzindo a metodologia de contagem microvascular (3). Desde os resultados promissores destas publicações, o papel da angiogênese tem sido extensamente investigado e ampliado a praticamente todos os tumores sólidos humanos (4).

Diversos fatores pró-angiogênicos são conhecidos, sendo o VEGF-A (também chamado apenas de VEGF) um dos principais promotores envolvidos no processo da angiogênese tumoral (5). Sua expressão tecidual investigada por

imunoistoquímica tem proporcionado achados importantes no desenvolvimento, estadiamento e prognóstico dos tumores gástricos (6, 7).

Uma meta-análise publicada em 2011 investigando a expressão da proteína VEGF na avaliação clínico-patológica de pacientes com câncer gástrico, demonstrou relação com a sobrevida (8), sendo um preditor independente de pior prognóstico (9). Estes achados apontam o VEGF como um marcador poderoso na identificação de pacientes com desfecho desfavorável além de ser alvo potencial no bloqueio da angiogênese e progressão do câncer gástrico. Com isso, este trabalho objetiva avaliar a expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na angiogênese do câncer gástrico correlacionando com seu estadiamento e sobrevida(9).

## **Material e Métodos**

### *Dados da amostra e estadiamento do câncer gástrico*

Para realização do presente trabalho foi desenvolvido estudo multicêntrico, no Hospital São Lucas da PUCRS (HSL) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), obtendo aprovação do Comitê de Ética em ambas instituições.

Neste estudo foram incluídas 45 amostras de adenocarcinomas gástricos ressecados cirurgicamente no Hospital São Lucas da PUCRS entre 1995 e 2005. O estadiamento patológico foi definido de acordo com o estabelecido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) na sua 7<sup>a</sup> edição e incluiu a profundidade de penetração do tumor na parede gástrica, comprometimento linfonodal e

presença de metástases à distância (10). Outras variáveis clínicas e histopatológicas analisadas foram a idade e sexo dos pacientes, classificação de *Lauren e Borrmann*, grau de diferenciação celular, tamanho do tumor e sobrevida.

#### *VEGF e avaliação imunoistoquímica*

Os tumores foram submetidos à avaliação da expressão imunoistoquímica para o VEGF, utilizando o anticorpo primário policlonal de coelho A-20 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*). A quantificação da expressão do VEGF foi realizada por análise digital com o software *Adobe Photoshop® CS3 extended 10.0 (Adobe Systems Inc. San Jose, CA, USA)*, através da contagem dos pixels corados pela reação imunoistoquímica. Foi utilizado um controle positivo e captura de 10 campos por análise, fornecendo um valor médio final para cada amostra. O nível de expressão da proteína (VEGF) foi determinado pela multiplicação da densidade média da imagem pelo percentual das áreas positivamente coradas pelo anticorpo (áreas de coloração marrom).

#### *Microdensidade vascular*

As mesmas amostras foram avaliadas em relação à microdensidade vascular (MVD). A marcação dos microvasos foi realizada pelo anticorpo CD34 (Class II, clone QBEnd 10; *DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA*) em cortes imediatamente adjacentes aos usados na identificação da área tumoral. A contagem dos microvasos foi feita pela seleção dos pontos mais vascularizados

(*hot spots*), com auxílio do software *Image Pro-Plus 3.0* (*Media Cybernetics® Inc, Silver Spring, USA*). O resultado final da contagem de cada amostra foi obtido pela média aritmética de 20 campos selecionados.

### *Análise estatística*

Para variáveis quantitativas e análise descritiva foram utilizadas médias, desvios-padrão, valores máximos e mínimos. As variáveis qualitativas foram demonstradas utilizando percentuais. A comparação entre a expressão do VEGF e as variáveis clínico-patológicas foi realizada pelo teste exato de Fisher ou qui-quadrado.

As taxas de sobrevida foram calculadas utilizando-se o método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas pelo teste de *log-rank*. A influência de cada variável na sobrevida foi avaliada pelo modelo de regressão de Cox. Os níveis de significância adotados são de 5% ( $p < 0,05$ ) nas análises bi e multivariadas. As análises foram realizadas com a utilização do software SPSS versão 18.0 (SPSS INC., Chicago IL, USA).

## **Resultados**

### *Dados clínico-patológicos da amostra*

A média de idade dos pacientes estudados foi de 63,6 anos ( $\pm 10,4$ ), sendo 73,3% indivíduos do sexo masculino. A localização mais comum do tumor foi no terço proximal do estômago (16 casos), seguida dos terços médio e distal, ambos

com 13 casos. Em 3 pacientes (6,67%) o tumor estava presente difusamente em todo órgão. O tamanho médio do tumor foi de 6,8cm ( $\pm 4,1$ ), medindo o menor 1,5cm e o maior 20cm no maior diâmetro (Tabela 1).

**Tabela 1 (artigo) - Características clínico-patológicas da amostra.**

<b>Média de idade</b> (anos)	63,6 $\pm$ 10,4
<b>Sexo masc:fem</b> (%)	73,3:26,7
<b>Tamanho do tumor</b> (cm)	6,8 $\pm$ 4,1
<b>Localização do tumor</b>	
Proximal <i>n</i> (%)	16 (35,5)
Médio <i>n</i> (%)	13 (28,8)
Distal <i>n</i> (%)	13 (28,8)
Todo órgão <i>n</i> (%)	3 (6,6)

Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou frequências e porcentagem, n=45.

Considerando a classificação macroscópica de *Borrmann*, os tumores do tipo úlcero-infiltrativos estavam presentes em 40% dos casos, seguidos pelo tipo difuso (28,8%) e ulcerado (24,4%). Tumores com invasão da camada muscular própria (T2), caracterizados como avançados, representaram 95,5% da amostra. Quanto ao grau de diferenciação histológica das neoplasias, predominaram os adenocarcinomas moderadamente diferenciados (G2) e pouco diferenciados (G3) com 53% e 44%, respectivamente. De acordo com a classificação de *Lauren*, foram identificados 42,2% do tipo intestinal e 40% do tipo difuso, sendo o restante (8%) caracterizado como misto. Na Tabela 2 estão representadas as classificações macroscópicas e histológicas citadas.

Os componentes do estadiamento patológico pTNM também foram avaliados quanto a penetração do tumor primário na parede gástrica (T),

comprometimento linfonodal (N) e presença de metástase à distância (M) conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 2 (artigo)** - Classificação de *Borrmann*, *Lauren* e diferenciação celular.

<b>Classificação de <i>Borrmann</i></b>	<b>n° (%)</b>
0 - Não macroscópico	3 (6,6)
1 - Polipóide	0 (0,0)
2 - Ulcerado	11 (24,4)
3 - Úlcero-infiltrativo	18 (40,0)
4 - Difuso	13 (28,8)
<b>Classificação de <i>Lauren</i></b>	<b>n° (%)</b>
Intestinal	19 (42,2)
Difuso	18 (40,0)
Misto	8 (17,7)
<b>Grau de Diferenciação</b>	<b>n° (%)</b>
G1 - Bem diferenciado	1 (2,22)
G2 - Moderadamente diferenciado	24 (53,2)
G3 - Pouco diferenciado	20 (44,4)
G4 - Indiferenciado	0 (0)

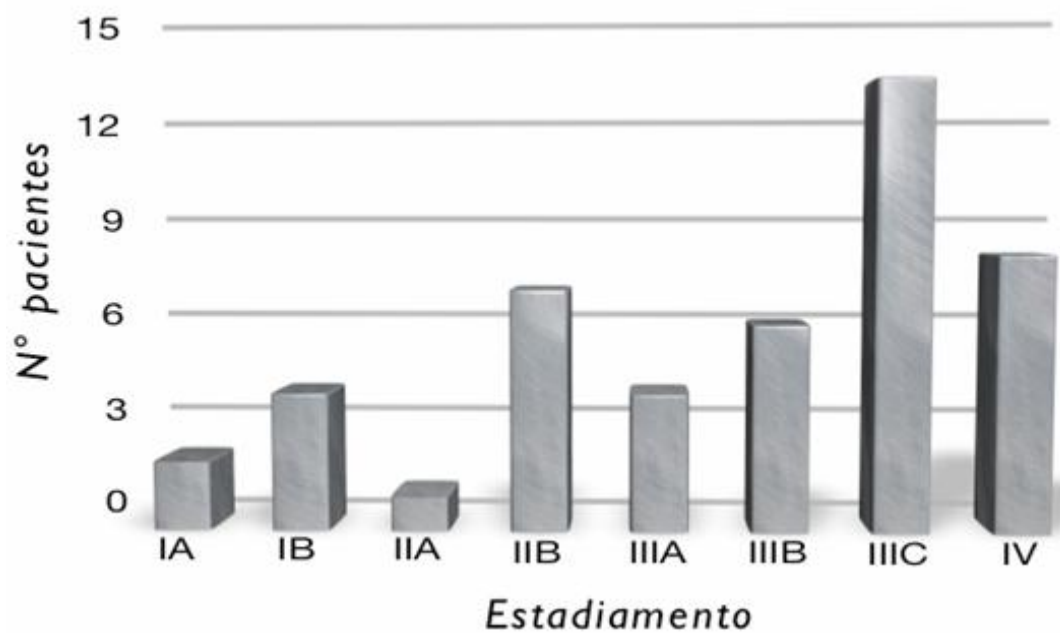
Dados apresentados como frequências e porcentagem, n=45.

**Tabela 3 (artigo)** - Distribuição da amostra em relação a penetração do tumor.

<b>T Tumor primário</b>	<b>n° (%)</b>
T1a Invade lâmina própria	1 (2,2)
T1b Invade a submucosa	1 (2,2)
T2 Invade a muscular própria	4 (8,8)
T3 Invade a subserosa	5 (11,1)
T4a Invade a serosa	29 (64,4)
T4b Invade órgãos adjacentes	5 (11,1)
<b>N Linfonodos regionais</b>	<b>n° (%)</b>
N0 Nenhum	13 (28,8)
N1 De 1 a 2 linfonodos	5 (11,1)
N2 De 3 a 6 linfonodos	12 (26,6)
N3 Mais que 7	1 (2,2)
N3a De 7 a 15	6 (13,3)
N3b Mais que 16	8 (17,7)
<b>M Metástase à distância</b>	<b>n° (%)</b>
M0	41 (91,1)
M1	4 (8,9)

Dados apresentados como frequências e porcentagem, n=45.

Os pacientes nos estágios IIIC e IV compreendem quase a metade da amostra estudada (46,6%). Nestes pacientes já havia comprometimento da camada serosa do órgão ou presença de metástase à distância. A Figura 1 demonstra a distribuição global dos pacientes por estágio TNM patológico.

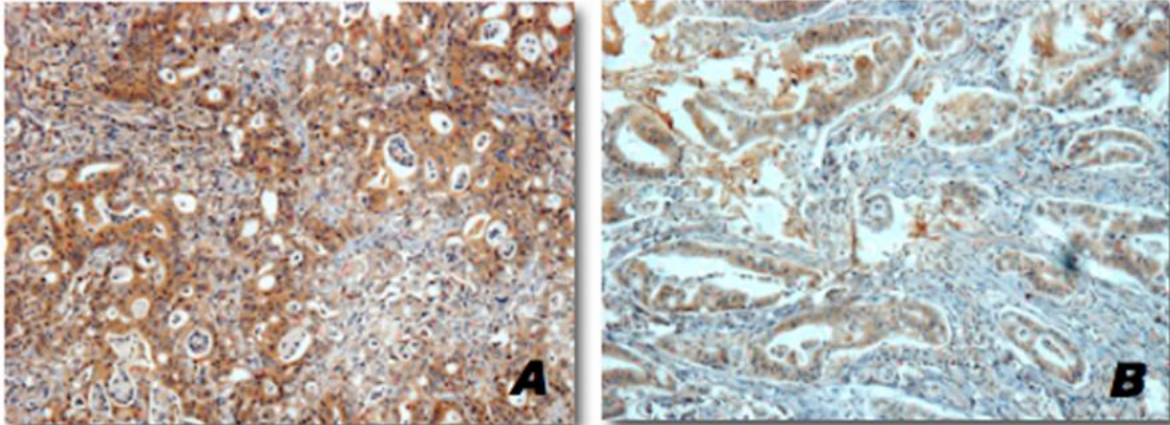


**Figura 1 (artigo):** Distribuição total da amostra por frequência de estadiamento pTNM.

#### *Expressão imunoistoquímica do VEGF*

A porcentagem da expressão tecidual da amostra variou de 24,26 a 44,43. A média foi de 30,23% ( $\pm 4,23$ ) e a mediana de 29,54%. O valor de 30% foi utilizado como ponto de corte, dividindo a amostra em dois grupos (VEGF com escore igual ou acima de 30% e VEGF com escore abaixo de 30%). A Figura 2 demonstra a expressão tecidual do VEGF.

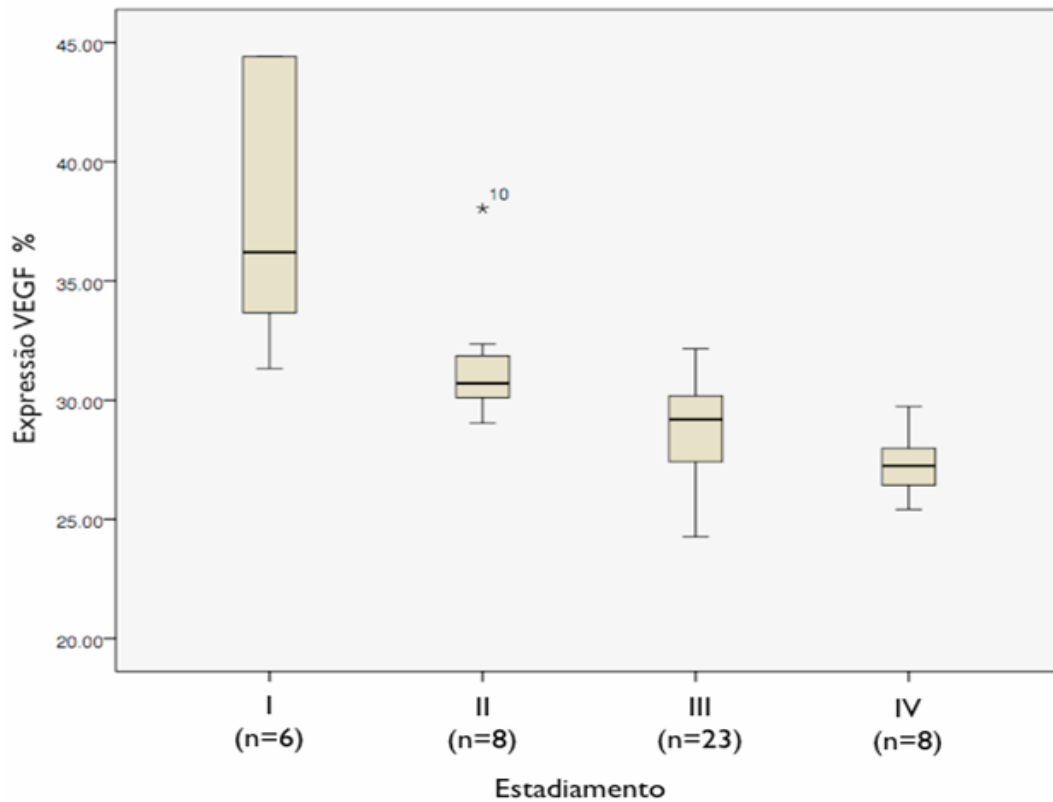




**Figura 2 (artigo):** Fotomicrografia de adenocarcinoma gástrico em aumento de 400 X. Exame imunoistoquímico demonstrando expressão do VEGF (coloração marrom) com escore acima de 30% (A) e abaixo de 30% (B).

#### *Relação da expressão do VEGF e estadiamento*

Foi observada associação inversa na expressão do VEGF e estadiamento TNM patológico. Os estadiamentos IA e IB apresentaram maior expressão tecidual da proteína quando comparados (ANOVA) com os estadiamentos II, III e IV ( $p < 0,001$ ). (Figura 3).



**Figura 3 (artigo):** Associação entre expressão do VEGF e estadiamento TNM patológico.

A força de associação do VEGF com o estadiamento foi analisada pelo teste exato de Fisher, considerando a penetração na parede gástrica (T), comprometimento linfonodal (N) e presença de metástase à distância (M). O tamanho do tumor, grau de diferenciação celular (G), classificação de *Borrmann* e *Lauren* também foram investigados. Houve diferença significativa no grau de penetração do tumor na parede gástrica ( $p < 0,003$ ) e comprometimento linfonodal ( $p < 0,001$ ). A sobrevida mediana em 20 meses foi maior no grupo com expressão mais intensa do VEGF ( $p < 0,003$ ) (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4 (artigo)** - Associação do VEGF com estadiamento pT, pN e M.

	<b>VEGF &lt; 30%</b>	<b>VEGF ≥ 30%</b>	<b>P</b>
	n=26	n=19	
<b>Penetração na parede</b>			
T1 e T2	0 (0,0)	6 (31,6)	0,003*
T3 e T4	26 (100)	13 (68,4)	
<b>Linfonodos</b>			
N0	2 (7,7)	11 (57,9)	0,001*
N1 a N3b	24 (92,3)	8 (42,1)	
<b>Metástase à distância</b>			
M0	22 (84,6)	19 (100)	0,126
M1	4 (15,4)	0 (0,0)	

\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

**Tabela 5 (artigo)** - Associação do VEGF com características histopatológicas e sobrevida.

	<b>VEGF &lt; 30%</b>	<b>VEGF ≥ 30%</b>	<b>P</b>
	n=26	n=19	
<b>Classificação Borrmann</b>			
Polipóide / Ulcerado	17 (65,4)	15 (78,9)	0,321
Úlcero-infiltrativo / Difuso	9 (34,6)	4 (21,1)	
<b>Classificação de Lauren</b>			
Intestinal	10 (38,5)	9 (47,4)	0,550
Difuso / misto	16 (61,5)	10 (52,6)	
<b>Tamanho do tumor (cm)</b>			
<5	8 (30,8)	8 (42,1)	0,433
≥5	18 (69,2)	11 (57,9)	
<b>Diferenciação celular</b>			
Bem / moderadamente	13 (50,0)	12 (63,2)	0,380
Pouco / Indiferenciado	13 (50,0)	7 (36,8)	
<b>Sobrevida</b>			
Mediana (meses)	11,0±6,4	24,0±13,8	0,003*
Em 5 anos (%)	10,3±6,3	43,0±6,12	

\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Para verificar a associação da sobrevida com um conjunto de fatores prognósticos, foram utilizadas análises de regressão logística de Cox (*Hazard Ratio*). A expressão aumentada de VEGF ( $\geq 30\%$ ) demonstrou associação com maior tempo de sobrevida (HR 0,35; IC95%: 0,17- 0,74) na análise univariada, mantendo esta relação quando ajustada para possíveis fatores de confusão (idade, classificação histológica de *Lauren* e diferenciação celular) (HR 0,37; IC95%: 0,17-0,79) Tabela 6.

**Tabela 6 (artigo)** - Análise de sobrevida pelo modelo de regressão de Cox com análise uni e multivariável.

	UNIVARIADA			MULTIVARIÁVEL		
	HR	IC 95%	P	HR**	IC 95%	P
VEGF $\geq 30$	0,35	0,17 a 0,74	0,006*	0,37	0,17 a 0,79	0,010*
Idade $\geq 60$ anos	1,31	0,62 a 2,76	0,463	1,47	0,69 a 3,10	0,313
Sexo masculino	0,85	0,39 a 1,82	0,681	–	–	–
T3 e T4 (penetração parede)	2,86	0,86 a 9,47	0,084	–	–	–
Linfonodos positivos	2,42	1,07 a 5,44	0,033*	–	–	–
Borrmann difuso	1,61	0,79 a 3,30	0,186	–	–	–
Lauren difuso	1,89	0,93 a 3,83	0,075	1,04	0,34 a 3,18	0,945
Tamanho tumor $>5$	1,30	0,63 a 2,68	0,476	–	–	–
G3 pouco diferenciado	2,65	1,31 a 5,36	0,007*	2,51	0,81 a 7,71	0,107

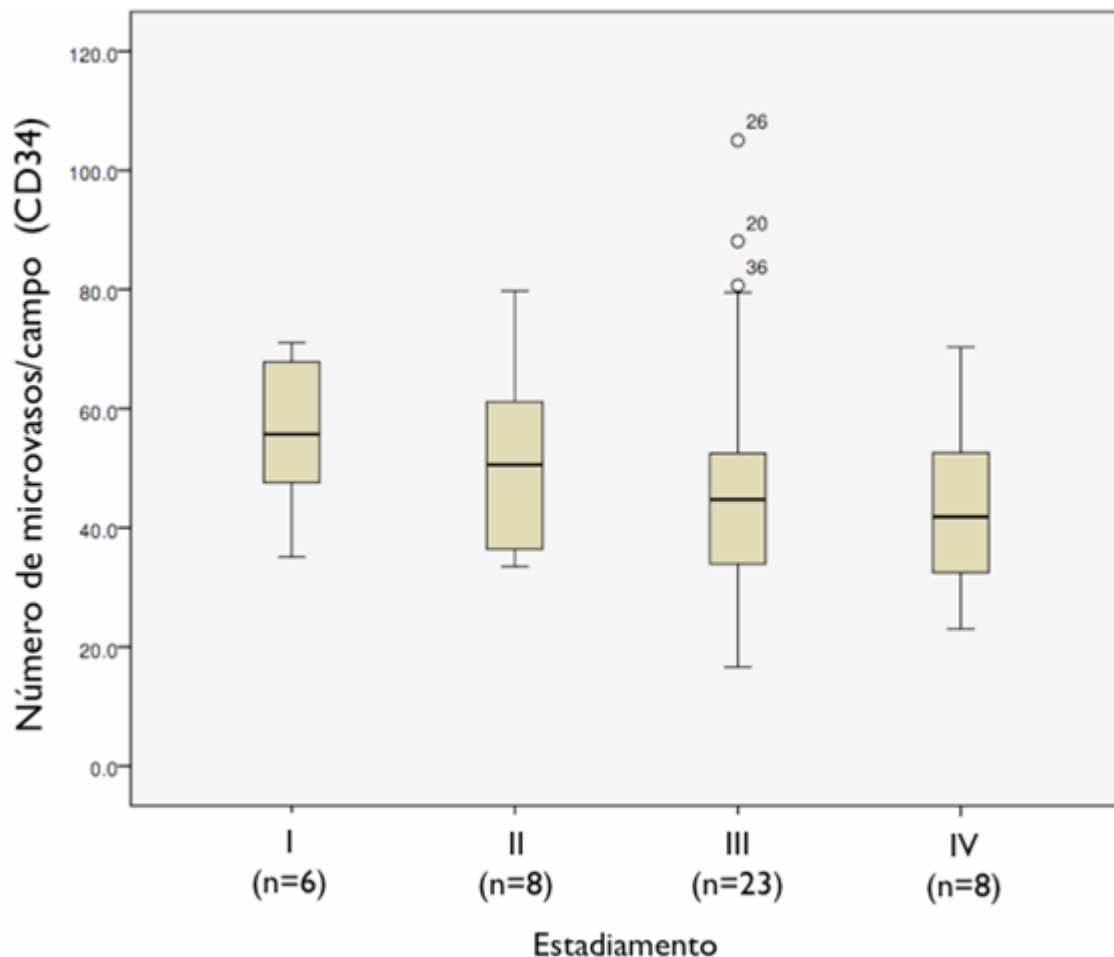
\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ . (n=45; óbitos=34).

HR: Hazard ratio não ajustado; IC: intervalo de confiança; P: significância estatística;

HR\*\*: Hazard ratio ajustado obtido em modelo de regressão de azares proporcionais de Cox com fatores selecionados. VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular.

### Densidade microvascular e estadiamento

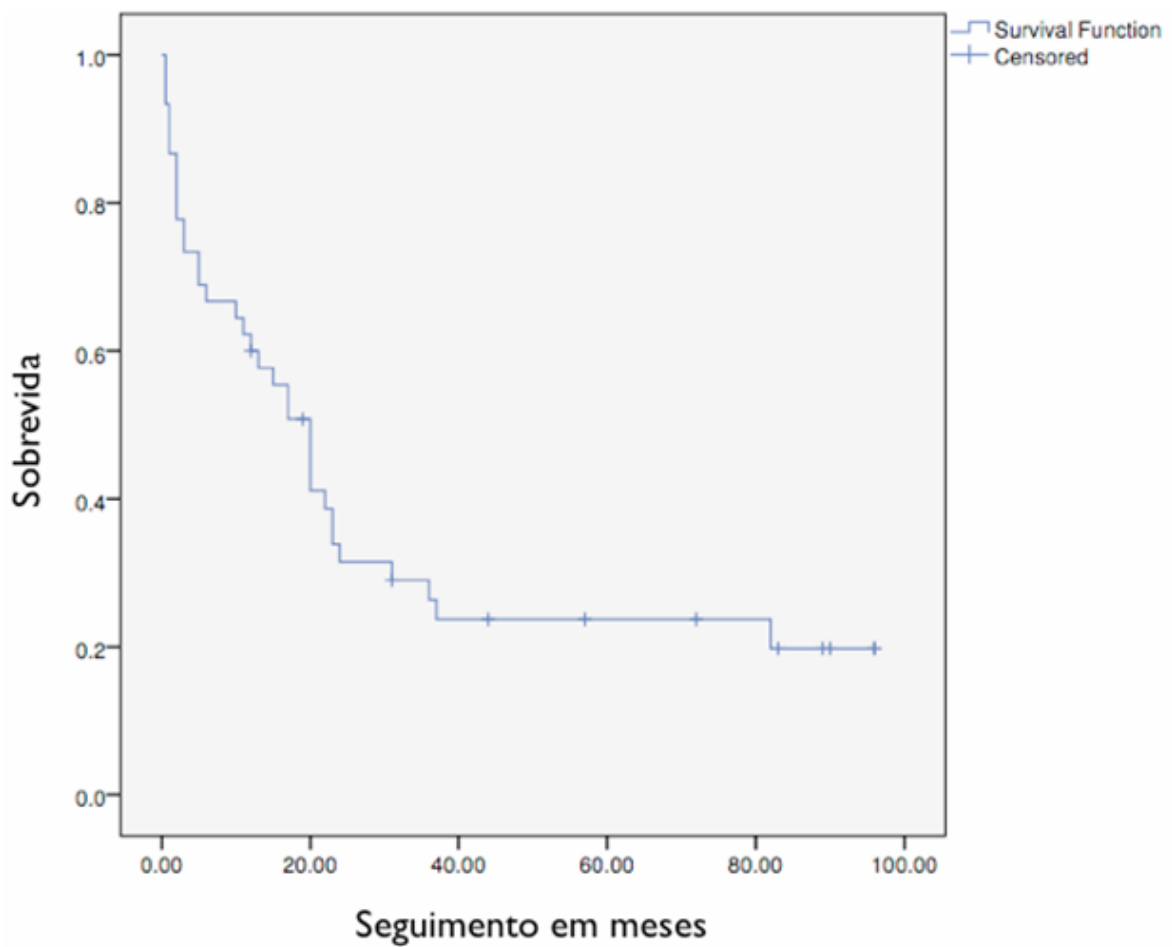
A avaliação da densidade vascular foi realizada pela contagens de vasos em áreas de maior vascularização conforme descrito anteriormente. Apresentou variação de 16,9 a 105 vasos/campo ( $\pm 19.39$ ). A análise da microdensidade vascular não demonstrou diferença significativa em relação ao estadiamento, embora os tumores classificados no estágio IA tenham apresentado maior densidade microvascular quando comparados com os demais estágios (Figura 4).



**Figura 4 (artigo):** Relação microdensidade vascular com estadiamento TNM patológico.

### Análise de sobrevida global

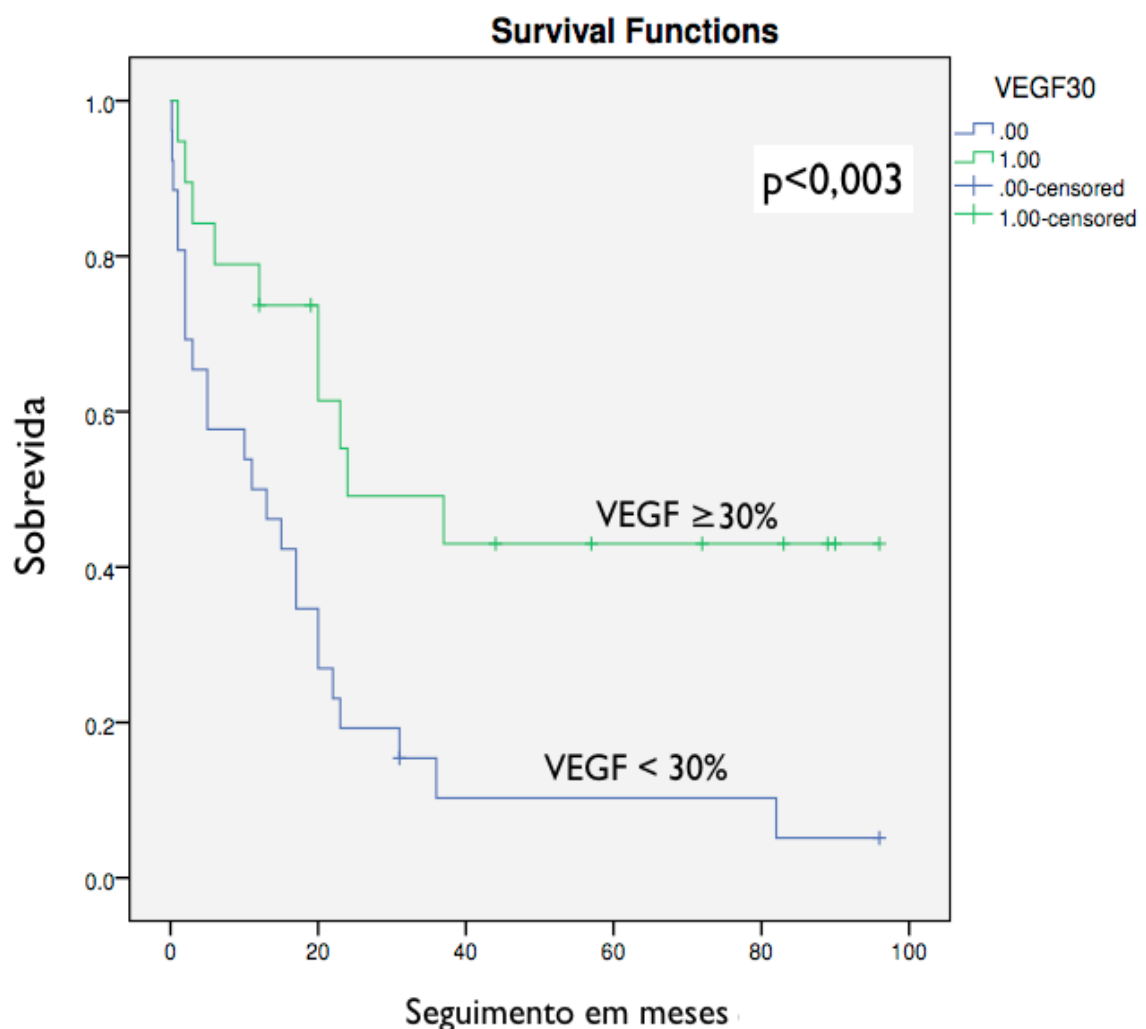
O tempo total de seguimento foi de 96 meses. Apenas 11 pacientes (24,4%) continuavam vivos até o final do estudo. A sobrevida global em 5 anos calculada pela curva de Kaplan-Meier foi de 23,7% (figura 5).



**Figura 5 (artigo):** Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global.

### Relação da sobrevida com a expressão do VEGF

Observou-se maior tempo da sobrevida no grupo de pacientes que expressavam mais intensamente o VEGF. Os pacientes com escore de expressão imunohistoquímica igual ou maior que 30, viveram em média 24,0 ( $\pm 13,8$ ) meses quando comparados aos pacientes que apresentavam escore abaixo de 30 ( $11,0 \pm 6,4$ ). A diferença foi significativa para  $p < 0,003$ .



**Figura 6 (artigo):** Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de acordo com a expressão do VEGF.

## Discussão

No câncer de estômago variáveis relacionadas ao estadiamento como grau de penetração na parede gástrica, envolvimento linfonodal, presença de metástases, tipo histológico e grau de diferenciação celular, são elementos importantes no prognóstico e sobrevida, influenciando diretamente na escolha do tratamento.

Fatores pró-angiogênicos secretados pelas células tumorais e sua associação com características clínico-patológicas são motivo de pesquisas na busca de marcadores prognósticos e possíveis alvos terapêuticos (11, 12).

O VEGF por ser um potente promotor da angiogênese, vem sendo amplamente estudado e sua expressão tecidual está descrita em diversas publicações como fator independente de pior prognóstico no câncer gástrico (9).

Em situações de hipóxia, o VEGF promove intensa proliferação celular, aumento da permeabilidade vascular e inibição da apoptose, induzindo a angiogênese (13). Desempenha desta maneira, papel importante no desenvolvimento de tumores sólidos e na formação de metástases. Liga-se a receptores tirosina quinase (VEGFR-1 e VEGFR-2) e sua expressão tecidual pode ser avaliada por técnica de imunistoquímica (14).

O método de avaliação imunistoquímica empregando softwares para análise de imagem, permite identificar de maneira mais eficiente áreas de interesse coradas pelos reagentes. Apesar de não haver consenso em relação ao melhor método de análise digital, esta vem sendo amplamente empregada em



exames imunoistoquímicos e demonstra ser mais confiável na mensuração de marcadores do que a avaliação exclusivamente visual e subjetiva (15).

Embora a maioria dos trabalhos correlacione a expressão aumentada do VEGF ao pior prognóstico no câncer gástrico, ainda não está plenamente claro seu papel como possível biomarcador na prática clínica. Alguns autores demonstraram ausência (16) ou relação inversa na expressão do VEGF com o estadiamento do câncer gástrico. Cabuk *et al.*, em 2007 (17), verificaram maior expressão do VEGF em tumores sem invasão da camada serosa quando comparados a estadiamentos avançados. Schimanski *et al.*, em 2011 avaliaram a expressão do VEGF em amostras de 69 adenocarcinomas gástricos, observando relação inversa do VEGF com metástase à distância e estadiamento (18).

Os resultados conflitantes na literatura provavelmente se devem a diferentes metodologias na avaliação do VEGF, número diverso de amostras incluídas nas pesquisas e polimorfismo genético das neoplasias investigadas.

No presente estudo a avaliação imunoistoquímica do VEGF em 45 amostras de adenocarcinomas gástricos demonstrou correlação inversa de sua expressão com o estadiamento patológico. Os estadiamentos IA e IB apresentaram maior expressão tecidual da proteína quando comparados com os estadiamentos II, III e IV ( $p < 0,001$ ).

Quando investigada isoladamente a penetração tumoral na parede gástrica, as lesões nos grupos T1 e T2 obtiveram maiores escores de expressão do VEGF em relação aos estadiamentos T3 e T4 (Invasão de serosa e órgãos adjacentes) ( $p < 0,003$ ). A mesma relação foi identificada no comprometimento

linfonodal dos pacientes estudados, sendo a maior expressão encontrada no grupo de pacientes sem linfonodos positivos (N0) ( $p < 0.001$ ).

Variáveis histopatológicas como grau de diferenciação celular e classificação de *Lauren* são de importância clínica, pois tumores do tipo difuso e pouco diferenciados, apresentam comportamento mais agressivo com pior prognóstico. Na avaliação de 150 amostras de tumores gástricos, realizada por Demash *et al.*, em 2011 (19), a maior expressão de VEGF foi encontrada em tumores difusos com pouca diferenciação celular quando comparados com o tipo intestinal ( $p < 0,01$ ).

Na nossa amostra a proporção de tumores do tipo intestinal e difuso foi semelhante, não sendo observada diferença significativa na expressão do VEGF na comparação com a classificação de *Lauren*.

A meta-análise publicada por Chen *et al.*, (8) descreve tendência de correlação positiva do VEGF com idade ( $>60$  anos,  $p = 0,005$ ), tamanho do tumor e grau de diferenciação histológica no câncer gástrico. No presente estudo tal associação não foi significativa em relação as variáveis descritas. Também não houve diferença em relação a classificação de *Borrmann* e tamanho do tumor na comparação com a expressão do VEGF.

Os pacientes incluídos neste estudo tiveram seguimento por 96 meses e a sobrevida mediana calculada em 20 meses. Escores de VEGF  $\geq 30$  foram associados com maior tempo de sobrevida ( $p < 0,003$ ). A análise de regressão multivariada foi empregada para evitar interferências de fatores de confusão (idade, classificação de *Lauren* e diferenciação celular). Após o ajuste dessas variáveis, a maior sobrevida se manteve relacionada com maior expressão do

VEGF (HR 0,37; IC95%: 0,17-0,79) sendo este, um fator prognóstico positivo independente para sobrevida nesta amostra. Este comportamento também é verificado na curva de sobrevida de Kaplan-Meier com diferença significativa no tempo de sobrevida entre grupos de maior e menor expressão do VEGF.

A avaliação da microdensidade vascular (MDV) é realizada pela contagem de microvasos em seções histológicas tumorais, empregando técnica de imunistoquímica e uso de anticorpos monoclonais para marcação do endotélio vascular (CD31 ou CD34) (20). A relação da MDV com pior prognóstico tem sido demonstrada no câncer gástrico (21) e está relacionada com estadiamentos mais avançados e pior sobrevida (21, 22). Este achado não foi reproduzido em nosso estudo, sendo a maior média de microvasos/campo identificada no estágio IA(63,56) comparada com estágios IB(51,48), IIA(45,95), IIB(51,94,09), IIIA(35,9), IIIB(42,5), IIIC(54,74) e IV(43,4). Esta relação entre a MDV e estadiamento repete a mesma tendência verificada na apresentação do VEGF, embora a MDV não tenha apresentado diferença significativa na comparação entre os grupos.

O achado de maior expressão imunistoquímica do VEGF em estadiamentos iniciais verificado nesse estudo pode ter explicação no pequeno número da amostra e sua distribuição assimétrica concentrada nos estadiamentos mais avançados. Outra hipótese pode ser discutida levando em consideração a teoria do "gatilho angiogênico" (*Angiogenic Switch*) (24), na qual tumores quiescentes em hipóxia necessitando vascularização, apresentariam estímulo angiogênico aumentado e conseqüentemente maior concentração de VEGF. Takahashi *et al.*, em 2003 (25) estudaram o gatilho angiogênico comparando tumores de cólon restritos à mucosa (Tis), tumores com invasão de submucosa

(T1) e invasão da muscular própria (T2). A intensidade de expressão do VEGF foi mais significativa na progressão tumoral de Tis para T1 ( $p < 0,001$ ) evidenciando forte expressão tecidual nos estágios iniciais dos tumores de cólon na amostra estudada(25).

Os resultados do presente estudo reproduziram o fenômeno relacionado ao gatilho angiogênico descrito acima, apresentando maior expressão de VEGF em fases iniciais do desenvolvimento do câncer gástrico (T1a e T1b).

O estudo de precursores do VEGF nas rotas moleculares da angiogênese e a inclusão de mais pacientes com tumores precoces, possivelmente permitirá esclarecer a relação da expressão desta proteína com o estadiamento do câncer gástrico.

Os processos de regulação da angiogênese são bastante complexos e não estão completamente elucidados. A descoberta de novos fatores e rotas moleculares na última década, permitiu a utilização clínica de agentes anti-angiogênicos de maneira isolada ou em combinação com terapias convencionais em diversos tipos de câncer (26).

Avanços no entendimento da carcinogênese e seus mecanismos moleculares permitirão no futuro, customizar a terapêutica das diversas apresentações do câncer gástrico às características individuais de cada paciente.

## **Conclusão**

Os resultados deste estudo demonstraram relação do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) com o estadiamento do câncer gástrico. Pacientes com tumores precoces apresentaram maior expressão imunohistoquímica do VEGF. O maior grau de penetração do tumor na parede gástrica e a presença de linfonodos positivos foi significativamente maior nos tumores que expressavam menos intensamente o VEGF.

Os pacientes com expressão aumentada de VEGF apresentaram maior sobrevida na análise univariada e também multivariável após ajuste de possíveis fatores de confusão, sugerindo neste estudo o valor prognóstico positivo e independente do VEGF no tempo sobrevida.

Não houve significância estatística na densidade microvascular (MDV) em relação à sobrevida e estadiamento do câncer gástrico, embora tenha sido verificada maior MDV em tumores no estadiamento IA.

## Referências

1. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood cells, molecules & diseases*. 2007;39(2):212-20. doi:10.1016/j.bcmd.2007.04.001
2. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Annals of surgery*. 1966;164(3):491-502.
3. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1991;324(1):1-8. doi:10.1056/NEJM199101033240101
4. Berz D, Wanebo H. Targeting the growth factors and angiogenesis pathways: small molecules in solid tumors. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(6):574-86. doi:10.1002/jso.21776
5. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 20):3487-95. doi:10.1242/jcs.016410
6. Lee GH, Joo YE, Koh YS, et al. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2006;18(9):957-63. doi:10.1097/01.meg.0000230086.83792.56
7. Iordache S, Saftoiu A, Georgescu CV, et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel density--two useful tools for the assessment of prognosis and survival in gastric cancer patients. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*. 2010;19(2):135-9.
8. Chen J, Li T, Wu Y, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma: a meta-analysis. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(12):1799-812. doi:10.1007/s00432-011-1057-2
9. Vidal O, Soriano-Izquierdo A, Pera M, et al. Positive VEGF immunostaining independently predicts poor prognosis in curatively resected gastric cancer patients: results of a study assessing a panel of angiogenic markers. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2008;12(6):1005-14. doi:10.1007/s11605-007-0336-3
10. Kwon SJ. Evaluation of the 7th UICC TNM Staging System of Gastric Cancer. *Journal of gastric cancer*. 2011;11(2):78-85. doi:10.5230/jgc.2011.11.2.78

11. Henkin J, Volpert OV. Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15(12):1369-86. doi:10.1517/14728222.2011.640319
12. Young R, Reed M. Anti-angiogenic Therapy: Concept to Clinic. *Microcirculation*. 2011. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00147.x
13. Coma S, Shimizu A, Klagsbrun M. Hypoxia induces tumor and endothelial cell migration in a semaphorin 3F- and VEGF-dependent manner via transcriptional repression of their common receptor neuropilin 2. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(3):266-75.
14. Kafousi M, Vrekoussis T, Tsenteliero E, et al. Immunohistochemical Study of the Angiogenic Network of VEGF, HIF1alpha, VEGFR-2 and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Human Breast Cancer. *Pathology oncology research : POR*. 2012;18(1):33-41. doi:10.1007/s12253-011-9413-8
15. Boettcher M, Gloe T, de Wit C. Semiautomatic quantification of angiogenesis. *The Journal of surgical research*. 2010;162(1):132-9. doi:10.1016/j.jss.2008.12.009
16. Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, et al. No association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-C expression with survival in patients with gastric cancer. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2009;41(4):218-23. doi:10.4143/crt.2009.41.4.218
17. Cabuk D, Basaran G, Celikel C, et al. Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology*. 2007;72(1-2):111-7. doi:10.1159/111118
18. Schimanski CC, Schlaegel F, Jordan M, et al. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery. *World journal of surgery*. 2011;35(5):1010-6. doi:10.1007/s00268-011-1041-7
19. Demash DV, Bazas VM, Lukianova NY, et al. Molecular profile of gastric cancer as a basis of individualized treatment and prognosis of disease outcome. *Exp Oncol*. 2011 Sep;33(3):182-5.
20. Yilmazer D, Han U, Onal B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. *International urology and nephrology*. 2007;39(3):691-8. doi:10.1007/s11255-006-9123-4
21. Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, et al. Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish*

*Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* 2011;13(2):133-8.

22. Aurello P, Bellagamba R, Rossi Del Monte S, et al. Apoptosis and microvessel density in gastric cancer: correlation with tumor stage and prognosis. *The American surgeon.* 2009;75(12):1183-8.

23. Zhao HC, Qin R, Chen XX, et al. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2006;12(47):7598-603.

24. Moserle L, Amadori A, Indraccolo S. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. *Current molecular medicine.* 2009;9(8):935-41.

25. Takahashi Y, Ellis LM, Mai M. The angiogenic switch of human colon cancer occurs simultaneous to initiation of invasion. *Oncology reports.* 2003;10(1):9-13.

26. Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park SR, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(30):3968-76. Epub 2011/08/17.



## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

Neste estudo podemos verificar a utilidade da imunistoquímica na avaliação de expressão do VEGF e o emprego da análise digital como método de mensuração da intensidade desse fator. A obtenção de escore de expressão possibilitou dividir a amostra em dois grupos distintos, facilitando a análise estatística dos dados.

A relação direta da expressão imunistoquímica com fatores prognósticos positivos foi um achado surpreendente e diverso do esperado, sendo também relatada por outros autores em estudos semelhantes.

As variáveis relacionadas aos fatores prognósticos tiveram diferenças significativas na comparação com a expressão do VEGF, indicando este marcador como preditor independente de maior sobrevida na amostra estudada.

O estudo do Fator Indutor de Hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) que atua diretamente na rota da angiogênese e a avaliação da expressão gênica do VEGF são temas promissores na pesquisa de marcadores moleculares prognósticos nos tumores gástricos.

## **ANEXOS**

---

**ANEXO A – Artigo submetido à publicação (versão inglês)**

**STAGING AND SURVIVAL IN GASTRIC CANCER:  
ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF-A)**

Luciano Silveira Eifler<sup>1</sup>, Luiz Felipe Forgiarini<sup>2</sup>, Marcelo Garcia Toneto<sup>3</sup>, Norma Possa Marroni<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Fellow Master's Degree, Medical Sciences Program  
Medical School of the Rio Grande do Sul Federal University  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS), Brazil

<sup>2</sup> Fellow Master's Degree, Pneumology Sciences Program  
Medical School of the Rio Grande do Sul Federal University  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS), Brazil

<sup>3</sup> PhD, Professor, Department of General Surgery  
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS)  
(Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS), Brazil

<sup>4</sup> PhD, Professor, Experimental Physiology and Hepatology Laboratory  
Medical School of the Rio Grande do Sul Federal University  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS), Brazil

---

***Corresponding Author***

Luciano Silveira Eifler  
Laboratório de Fisiologia e Hepatologia Experimental.  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2400 – Centro de pesquisa  
90035-003 - Porto Alegre, RS - Brazil  
Fone: +55 (51) 3359 8937  
E-mail: eifler@terra.com.br

---

***Acknowledgment***

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos.  
(FIPE-HCPA Project n°09-436)

## Abstract

**Background:** Vascular endothelial growth factor A (VEGF) is one of the main promoters of angiogenesis and correlates with gastric cancer (GC) prognosis.

**Aims:** To evaluate the correlation between immunohistochemical VEGF expression and the gastric cancer stage and survival rate. **Methods:** VEGF

expression was evaluated by immunohistochemistry in 45 adenocarcinoma specimens. Pathologic staging (pTNM), histological characteristics and survival were assessed using an ANOVA test, a multivariate analysis and the Kaplan-

Meier method. **Results:** A higher VEGF expression level was observed in stages IA and IB compared with II, III and IV ( $p < 0.001$ ).

A lower VEGF expression level correlated with a greater tumor penetration level in the gastric wall ( $p < 0.003$ ) and the extent of tumor spread to the lymph nodes ( $p < 0.001$ ).

Higher VEGF scores correlated with a longer survival time (HR 0.37; 95% CI: 0.17 - 0.79). **Conclusion:**

An inverse correlation was observed between VEGF expression and gastric tumor stage. A multivariate analysis demonstrates that VEGF expression is an independent prognostic factor for survival in gastric cancer.

**Running Title:** VEGF-A in gastric cancer

**Keywords:** VEGF-A, Angiogenesis, Staging, Prognosis, Gastric cancer.

## Introduction

Angiogenesis is the process of new blood vessel growth, and it occurs during embryonic and fetal development. Although usually absent in adults, angiogenesis is known to be an important step in rare situations such as reproduction and wound healing (1). In these situations, a balance between stimulatory and inhibitory factors allows angiogenesis to proceed in an orderly and self-limiting manner. During uncontrolled vascular multiplication, angiogenesis becomes pathological and allows the progression of many neoplastic and non-neoplastic diseases.

The concept of angiogenesis-dependent tumor growth originated in the early 1960s with the *in vitro* experiments performed by Folkman et al. (2). In the early 1990s, Weidner et al., while conducting studies on breast carcinoma, recognized angiogenesis as a prognostic factor in cancer and introduced the microvessel counting method (3). Since these seminal publications, the role of angiogenesis has been extensively investigated and extended to almost all human solid tumors (4).

Several pro-angiogenic factors are known. Among them, vascular endothelial growth factor A (also known as VEGF) is one of the main promoters of tumor angiogenesis (5). The analysis of VEGF expression using immunohistochemistry has enabled significant findings related to gastric tumor development, staging and prognosis (6, 7).

A meta-analysis study published in 2011, in which the clinicopathological role of VEGF expression in gastric cancer patients was investigated, correlated

VEGF expression with survival (8). Vidal et al. (2008) showed that positive VEGF immunostaining was an independent predictor of a poor prognosis. These findings suggest that VEGF is a powerful biomarker for the prediction of an unfavorable patient outcome and a potential therapeutic target to block angiogenesis and inhibit gastric cancer progression(9).

## **Methods**

### **Sample data collection and gastric cancer staging**

This multicentric study was conducted at Hospital São Lucas /PUCRS (HLS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), getting approval from Ethics Committee at both institutions. It included 45 samples of gastric adenocarcinoma surgically resected at the Hospital São Lucas da PUCRS between 1995 e 2005. The tumor staging was established according to the Union for International Cancer Control (UICC) and included three main factors: tumor penetration depth in the gastric wall, the extent of tumor spread to the lymph nodes and the presence of distant metastasis (10). Other clinical and histopathological variables analyzed included the age and gender of each patient, the Borrmann and Lauren classifications of each sample, the level of cellular differentiation, the tumor size and the survival status.

## **Evaluation of VEGF expression with immunohistochemistry**

VEGF expression levels were analyzed immunohistochemically using the VEGF (A-20) rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). The digital quantification of VEGF expression levels was performed using the Adobe Photoshop® CS3 Extended 10.0 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA), which counted the pixels stained by the immunohistochemical reaction. A positive control was utilized, and a total of 10 fields were assessed for each sample to obtain a final mean value. The VEGF protein expression level was determined by multiplying the mean density of the image by the percentage of the area that was positively stained (brown-colored areas).

## **Microvessel density**

The same samples were evaluated for microvessel density (MVD). Microvessels were stained using a CD34 antibody (Class II, clone QBEnd 10; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) in sections immediately adjacent to the identified tumor areas. The counting of microvessels was performed by selecting the most vascularized areas (hot spots) using the Image-Pro Plus 3.0 software (Media Cybernetics® Inc., Silver Spring, MD, USA). The final score for each sample was the arithmetic mean of 20 selected fields.

## **Statistical analysis**

The quantitative variables and the descriptive analysis were obtained by calculating the mean, the standard deviation and the maximum and minimum values. The values for the qualitative variables are shown as percentages. The VEGF expression levels and the clinicopathological variables were compared using Fisher's exact test or the chi-squared test.

The survival rates were calculated using the Kaplan-Meier method, and the curves were compared using the log-rank test. The influence of each variable on survival was evaluated using the Cox regression model. The significance levels were established at 5% ( $p < 0.05$ ) in the bivariate and multivariate analysis. The analysis were performed using the SPSS version 18.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).



## Results

### Clinicopathological data

The average age of the patients was 63.6 years ( $\pm 10.4$ ), and 73.3% of the patients were male. The most common tumor location was in the proximal third of the stomach (16 cases), followed by middle and distal thirds, which both had 13 cases. In 3 patients (6.67%) the tumor was diffused throughout the organ. The mean tumor size was 6.8 cm ( $\pm 4.1$ ), with the smallest measuring 1.5 cm in diameter and the largest measuring 20 cm in diameter (Table 1).

According to the Borrmann macroscopic classification, ulcerative-infiltrative tumors were present in the highest percentage (40%) of the cases, followed by diffuse (28.8%) and ulcerated (24.4%) tumor types. Tumors that invaded the muscularis propria layer (T2), characterized as advanced, accounted for 95.5% of the samples. Upon histological observation, 53% of the adenocarcinomas were classified as moderately differentiated (G2), and 44% were classified as poorly differentiated (G3). According to the Lauren classification, 42.2% of the tumors were of the intestinal type, 40% were of the diffuse type, and 8% were of a mixed type. Table 2 depicts the macroscopic and histological classifications.

TNM staging criteria, including the level of tumor penetration into the gastric wall (T), extent of tumor spread to the lymph nodes (N) and presence of distant metastasis (M), were also evaluated, as described in Table 3.

Patients in stages IIIC and IV comprised almost half of the evaluated samples (46.6%). These patients exhibited compromised serous membranes or

distant metastasis. Figure 1 shows the patient distribution by pathologic TNM stage.

### **VEGF immunohistochemistry**

The level of VEGF expression in the tissues ranged from 24.26 to 44.43%, with a mean of 30.23% ( $\pm 4.23\%$ ) and a median of 29.54%. A cutoff point of 30% divided the samples into two groups (<30% VEGF and  $\geq 30\%$  VEGF). Figure 2 shows the tissue expression of VEGF.

### **Correlation between VEGF expression and cancer staging**

An inverse correlation was observed between the VEGF expression level and the pathologic TNM stage. Stages IA and IB showed higher expression levels of VEGF in the tissue compared with stages II, III and IV when analyzed using the ANOVA test ( $p < 0.001$ ) (Figure 3).

The strength of the associations between VEGF expression and the TNM prognostic factors were analyzed using Fisher's exact test. The tumor size, the histological grade (G) and the Borrmann and Lauren classifications were also investigated. There were significant associations between the VEGF expression level and both the degree of tumor penetration in the gastric wall ( $p < 0.003$ ) and the extent of tumor spread to the lymph nodes ( $p < 0.001$ ).

The rate of survival at 20 months was higher in the group with higher VEGF expression levels ( $p < 0.003$ ) (Tables 4 and 5).

The Cox proportional hazards regression analysis was used to determine the hazard ratio (HR) to verify the association between survival and a set of prognostic factors. A high level of VEGF expression ( $\geq 30\%$ ) was associated with a longer survival time (HR 0.35; 95% CI: 0.17 - 0.74) in the univariate analysis, and this relationship was maintained after an adjustment for potential confounding factors (age, the Lauren histological classification and the level of cellular differentiation) (HR 0.37; 95% CI: 0.17 - 0.79) (Table 6).

### **Microvessel density and staging**

The microvessel density (MVD) analysis was performed by counting the vessels in areas of high vascularity, as previously described; the number of vessels per field ranged from 16.9 to 105 ( $\pm 19.39$ ). There was no significant difference in the MVD between the stages, although the tumors classified as stage IA had a higher MVD than those of the other stages (Figure 4).

### **Overall survival analysis**

The follow-up duration was 96 months. Only 11 patients (24.4%) were still alive at the end of the study. The 5-year survival rate, calculated using the Kaplan-Meier method, was 23.7% (Figure 5).

## **Correlation between survival and VEGF expression**

The VEGF expression level positively correlated with the patient survival status, i.e., a higher expression level often coincided with a longer survival time. The patients with a VEGF immunohistochemistry score  $\geq 30\%$  lived on average 24.0 ( $\pm 13.8$ ) months, whereas the patients with a score  $< 30\%$  had an average survival time of 11.0 ( $\pm 6.4$ ) months. The difference was significant at  $p < 0.003$ .

## **Discussion**

In stomach cancer, staging-related variables, such as the degree of tumor penetration into the gastric wall, the extent of tumor spread to the lymph nodes, the presence of metastasis, the histological type and the degree of cellular differentiation, are important predictors of prognosis and survival and directly influence the treatment choice.

The association of tumor cell-secreted pro-angiogenic factors with clinicopathological characteristics is of great interest to researchers for the establishment of prognostic markers and potential therapeutic targets (11, 12).

Vascular Endothelial Growth Factor has been widely studied and is regarded as a strong angiogenesis stimulator. Moreover, in several publications, the tissue expression level of VEGF is described as an independent predictor of poor prognosis in gastric cancer (9).

In a hypoxic environment, VEGF promotes rapid cell proliferation, increased

vascular permeability and the inhibition of apoptosis, inducing angiogenesis (13). VEGF plays an important role in solid tumor development and metastasis formation. VEGF binds to receptor tyrosine kinases (VEGFR-1 and VEGFR-2), and its expression in tissues can be evaluated by immunohistochemistry (14).

The use of image analysis software for the evaluation of immunohistochemistry allows for a more precise and efficient identification of the stained areas of interest. Although there is no consensus regarding the best digital analysis method, the method used in this study has been widely accepted for immunohistochemical tests, proving to be more reliable for the measurement of markers than visual and other subjective assessment methods (15).

Although most studies correlate a high VEGF expression level with a poor gastric cancer prognosis, the role of VEGF as a potential biomarker is still not completely understood. Some authors have observed an absence of VEGF expression in gastric cancer or an inverse correlation between VEGF expression and the gastric cancer stage (16). Cabuk et al. (2007) observed a higher VEGF expression level in tumors that did not invade the serous layer than in advanced-stage tumors (17). Schimanski et al. (2011) evaluated the VEGF expression levels in samples from 69 gastric adenocarcinomas and observed an inverse correlation between the VEGF expression level and both the stage and the presence of distant metastasis (18).

The conflicting reports in the literature are most likely due to the different methodologies used for the evaluation of the VEGF levels, the diverse number of samples and the genetic polymorphism of the tumors.

In this study, an immunohistochemical evaluation of VEGF levels in 45 samples of gastric adenocarcinoma showed an inverse correlation between the expression level and the pathologic stage. Stages IA and IB showed higher VEGF expression levels than stages II, III and IV ( $p < 0.001$ ).

When the level of tumor penetration in the gastric wall was investigated independently, the lesions from groups T1 and T2 had higher VEGF expression scores than the lesions from groups T3 and T4 (invasion of serosa and adjacent organs) ( $p < 0.003$ ). The same correlation was observed when the extent of tumor spread to the lymph nodes was investigated; the highest VEGF expression levels were found in patients without tumor-positive lymph nodes (N0) ( $p < 0.001$ ).

Histopathological variables, such as the degree of cellular differentiation and the Lauren classification, are of clinical relevance because diffuse and poorly differentiated tumors types exhibit more aggressive behavior and a worse prognosis. Demash et al. (2011) (19) evaluated 150 gastric tumor samples and observed that the highest VEGF expression levels were found in diffuse tumors with little cellular differentiation when compared with intestinal-type tumors ( $p < 0.01$ ).

In our sample set, the numbers of intestinal and diffuse tumor types were similar, and there was not a significant correlation between the VEGF expression level and the Lauren classification.

The meta-analysis published by Chen et al. (8) describes positive correlations of VEGF with age ( $>60$  years,  $p = 0.005$ ), tumor size and the degree of histological differentiation in gastric cancer. In our samples, no significant associations between the VEGF levels and the variables described were

observed. There were also no correlations between the VEGF expression levels and the Borrmann classification or the tumor size.

For follow-up analysis, the patients in this study were evaluated for 96 months, and the median survival time was estimated to be 20 months. VEGF scores  $\geq 30$  were associated with a longer survival time ( $p < 0.003$ ). A multivariate regression analysis was used to avoid interference from confounding factors (age, the Lauren classification and cellular differentiation). After adjusting for these variables, the increased survival rate remained associated with higher VEGF expression levels (HR 0.37; 95% CI: 0.17 - 0.79); for the samples in our study, the VEGF level can be considered to be an independent positive prognostic factor for survival. This relationship can also be observed in the Kaplan-Meier survival curve, which shows a significant difference in the survival time for the patients in the groups with high and low VEGF expression levels.

The MVD is assessed by counting the microvessels in the histological tumor sections after using immunohistochemistry and monoclonal antibodies (CD31 or CD34) to stain the vascular endothelium (20). A correlation between the MVD and poor prognosis has been demonstrated for gastric cancer, and the MVD is associated with a more advanced stage and a poor survival rate (21, 22). These findings were not corroborated by our study. Our results show that the highest average number of microvessels/field was in stage IA (63.56) compared with stages IB (51.48), IIA (45.95), IIB (51.94), IIIA (35.9), IIIB (42.5), IIIC (54.74) and IV (43.4). The correlation between the MVD and the stage follows the same trend observed for the correlation between the VEGF level and the stage, although the MVD was not significantly different between the groups.

In this study, the observation of higher VEGF expression levels in early-stage tumors may be explained by the small sample size and the asymmetric distribution of tumor types in the sample set, which contained more tumors in the advanced stages. Another explanation takes into account the angiogenic switch theory, in which quiescent hypoxic tumors requiring vascularization provide an increased angiogenic stimulus and, consequently, a higher concentration of VEGF (24). Takahashi et al. (2003) studied the angiogenic switch when comparing colonic tumors that were restricted to the mucosa (Tis), tumors that invaded the submucosa (T1) and tumors that invaded the muscularis propria (T2). The VEGF expression level increased significantly in the tumor progression from Tis to T1 ( $p < 0.001$ ), showing strong tissue expression in the early stages of colon tumors (25).

The results of this study reproduced the angiogenic switch phenomenon described above, showing higher VEGF expression levels in the early stages of gastric cancer development (T1a and T1b).

The study of VEGF precursors in angiogenesis molecular pathways and the inclusion of more patients with early-stage tumors may help to clarify the relationship between the VEGF expression level and the stage of gastric cancer.

The processes that regulate angiogenesis are complex and not fully elucidated. The discovery of new factors and molecular pathways in the last decade has led to the clinical use of anti-angiogenic agents, either alone or in combination with conventional therapies, to treat various types of cancer (26).



Advances in the understanding of carcinogenesis and its molecular mechanisms will allow for the future development of customized therapies for the treatment of gastric cancer.

## **Conclusion**

The results of this study demonstrated a correlation between the VEGF expression level and the gastric cancer stage. Patients with early-stage tumors showed a higher immunohistochemical VEGF expression level. The degree of tumor penetration into the gastric wall and the presence of tumor-positive lymph nodes were significantly higher in tumors expressing lower levels of VEGF.

Patients with increased VEGF expression levels survived longer in the univariate and multivariate analysis after the adjustment for potential confounders, suggesting that VEGF is a positive and independent prognostic predictor of the length of survival.

There was no statistically significant difference between the MVD and the survival rate or the gastric cancer stage, although a higher MVD was observed in the patients with stage IA tumors.

## References

1. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood cells, molecules & diseases*. 2007;39(2):212-20. doi:10.1016/j.bcmed.2007.04.001
2. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Annals of surgery*. 1966;164(3):491-502.
3. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1991;324(1):1-8. doi:10.1056/NEJM199101033240101
4. Berz D, Wanebo H. Targeting the growth factors and angiogenesis pathways: small molecules in solid tumors. *Journal of surgical oncology*. 2011;103(6):574-86. doi:10.1002/jso.21776
5. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 20):3487-95. doi:10.1242/jcs.016410
6. Lee GH, Joo YE, Koh YS, et al. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2006;18(9):957-63. doi:10.1097/01.meg.0000230086.83792.56

7. Iordache S, Saftoiu A, Georgescu CV, et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel density--two useful tools for the assessment of prognosis and survival in gastric cancer patients. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*. 2010;19(2):135-9.
8. Chen J, Li T, Wu Y, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma: a meta-analysis. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(12):1799-812. doi:10.1007/s00432-011-1057-2
9. Vidal O, Soriano-Izquierdo A, Pera M, et al. Positive VEGF immunostaining independently predicts poor prognosis in curatively resected gastric cancer patients: results of a study assessing a panel of angiogenic markers. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2008;12(6):1005-14. doi:10.1007/s11605-007-0336-3
10. Kwon SJ. Evaluation of the 7th UICC TNM Staging System of Gastric Cancer. *Journal of gastric cancer*. 2011;11(2):78-85. doi:10.5230/jgc.2011.11.2.78
11. Henkin J, Volpert OV. Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15(12):1369-86. doi:10.1517/14728222.2011.640319
12. Young R, Reed M. Anti-angiogenic Therapy: Concept to Clinic. *Microcirculation*. 2011. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00147.x

13. Coma S, Shimizu A, Klagsbrun M. Hypoxia induces tumor and endothelial cell migration in a semaphorin 3F- and VEGF-dependent manner via transcriptional repression of their common receptor neuropilin 2. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(3):266-75.
14. Kafousi M, Vrekoussis T, Tsenteliero E, et al. Immunohistochemical Study of the Angiogenic Network of VEGF, HIF1alpha, VEGFR-2 and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Human Breast Cancer. *Pathology oncology research : POR*. 2012;18(1):33-41. doi:10.1007/s12253-011-9413-8
15. Boettcher M, Gloe T, de Wit C. Semiautomatic quantification of angiogenesis. *The Journal of surgical research*. 2010;162(1):132-9. doi:10.1016/j.jss.2008.12.009
16. Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, et al. No association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-C expression with survival in patients with gastric cancer. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2009;41(4):218-23. doi:10.4143/crt.2009.41.4.218
17. Cabuk D, Basaran G, Celikel C, et al. Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology*. 2007;72(1-2):111-7. doi:10.1159/111118
18. Schimanski CC, Schlaegel F, Jordan M, et al. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery. *World journal of surgery*. 2011;35(5):1010-6. doi:10.1007/s00268-011-1041-7

19. Demash DV, Bazas VM, Lukianova NY, et al. Molecular profile of gastric cancer as a basis of individualized treatment and prognosis of disease outcome. *Exp Oncol*. 2011 Sep;33(3):182-5.
20. Yilmazer D, Han U, Onal B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. *International urology and nephrology*. 2007;39(3):691-8. doi:10.1007/s11255-006-9123-4
21. Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, et al. Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2011;13(2):133-8.
22. Aurello P, Bellagamba R, Rossi Del Monte S, et al. Apoptosis and microvessel density in gastric cancer: correlation with tumor stage and prognosis. *The American surgeon*. 2009;75(12):1183-8.
23. Zhao HC, Qin R, Chen XX, et al. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006;12(47):7598-603.
24. Moserle L, Amadori A, Indraccolo S. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. *Current molecular medicine*. 2009;9(8):935-41.

25. Takahashi Y, Ellis LM, Mai M. The angiogenic switch of human colon cancer occurs simultaneous to initiation of invasion. *Oncology reports*. 2003;10(1):9-13.

26. Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park SR, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(30):3968-76. Epub 2011/08/17.

**Table 1.** Clinicopathological characteristics ( $n=45$ ).

<b>Mean age (years)</b>	63.6 $\pm$ 10.4
<b>Sex male:female (%)</b>	73.3:26.7
<b>Tumor size (cm)</b>	6.8 $\pm$ 4.1
<b>Tumor Location</b>	
Upper third $n$ (%)	16 (35.5)
Middle third $n$ (%)	13 (28.8)
Lower third $n$ (%)	13 (28.8)
All organ $n$ (%)	3 (6.6)

*The data are presented as the frequency, the percentage or the mean  $\pm$  the standard deviation.*

**Table 2.** Borrmann and Lauren classifications and histological grade ( $n=45$ )

<b><i>Borrmann classification</i></b>	<b>n° (%)</b>
0 - Not macroscopic	3 (6.6)
1 - Polypoid	0 (0.0)
2 - Ulcerated	11 (24.4)
3 - Ulcerative-infiltrative	18 (40.0)
4 - Diffuse	13 (28.8)
<b><i>Lauren classification</i></b>	<b>n° (%)</b>
Intestinal	19 (42.2)
Diffuse	18 (40.0)
Mixed	8 (17.7)
<b><i>Histological grade</i></b>	<b>n° (%)</b>
G1 - Well differentiated	1 (2.22)
G2 - Moderately differentiated	24 (53.2)
G3 - Poorly differentiated	20 (44.4)
G4 - Undifferentiated	0 (0)

*The data are presented as the frequency and the percentage.*



**Table 3.** Sample distributions for the depth of gastric wall penetration, the extent of tumor spread to the lymph nodes and the presence of distant metastasis

<b>T Primary tumor</b>	<b>n° (%)</b>
T1a Invades lamina propria	1 (2.2)
T1b Invades submucosa	1 (2.2)
T2 Invades muscularis propria	4 (8.8)
T3 Invades subserosa	5 (11.1)
T4a Perforates serosa	29 (64.4)
T4b Invades adjacent organs	5 (11.1)
<b>N Regional lymph nodes</b>	<b>n° (%)</b>
N0 No lymph node metastasis	13 (28.8)
N1 1 to 2 lymph nodes	5 (11.1)
N2 3 to 6 lymph nodes	12 (26.6)
N3 7 or more lymph nodes	1 (2.2)
N3a 7 a 15 lymph nodes	6 (13.3)
N3b More than 16	8 (17.7)
<b>M Distant metastasis</b>	<b>n° (%)</b>
M0	41 (91.1)
M1	4 (8.9)

*The data are presented as the frequency and the percentage.*

**Table 4.** Association of VEGF with prognostic factors.

	VEGF < 30%	VEGF ≥ 30%	P
	n=26	n=19	
<b>Primary Tumor</b>			
T1 e T2	0 (0.0)	6 (31.6)	0.003*
T3 e T4	26 (100)	13 (68.4)	
<b>Lymph nodes</b>			
N0	2 (7.7)	11 (57.9)	0.001*
N1 a N3b	24 (92.3)	8 (42.1)	
<b>Metastasis</b>			
M0	22 (84.6)	19 (100)	0.126
M1	4 (15.4)	0 (0.0)	

*The data are presented as the frequency and the percentage.*

*\*Statistically significant at  $p < 0.05$ .*

**Table 5.** Association of VEGF with histopathological features and the survival rate.

	VEGF < 30%	VEGF ≥ 30%	P
	n=26	n=19	
<b>Borrmann</b>			
Polypoid /Ulcerated	17 (65.4)	15 (78.9)	0.321
Infiltrative/Diffuse	9 (34.6)	4 (21.1)	
<b>Lauren</b>			
Intestinal	10 (38.5)	9 (47.4)	0.550
Diffuse / mixed	16 (61.5)	10 (52.6)	
<b>Tumor size (cm)</b>			
<5	8 (30.8)	8 (42.1)	0.433
≥5	18 (69.2)	11 (57.9)	
<b>Grade</b>			
Well / moderately	13 (50.0)	12 (63.2)	0.380
Poorly / undifferentiated	13 (50.0)	7 (36.8)	
<b>Survival</b>			
20 (months)	11.0±6.4	24,0±13.8	0.003*
Five-year (%)	10.3±6.3	43,0±6.12	

*The data are presented as the frequency and the percentage.*

*\*Statistically significant at  $p < 0.05$ .*

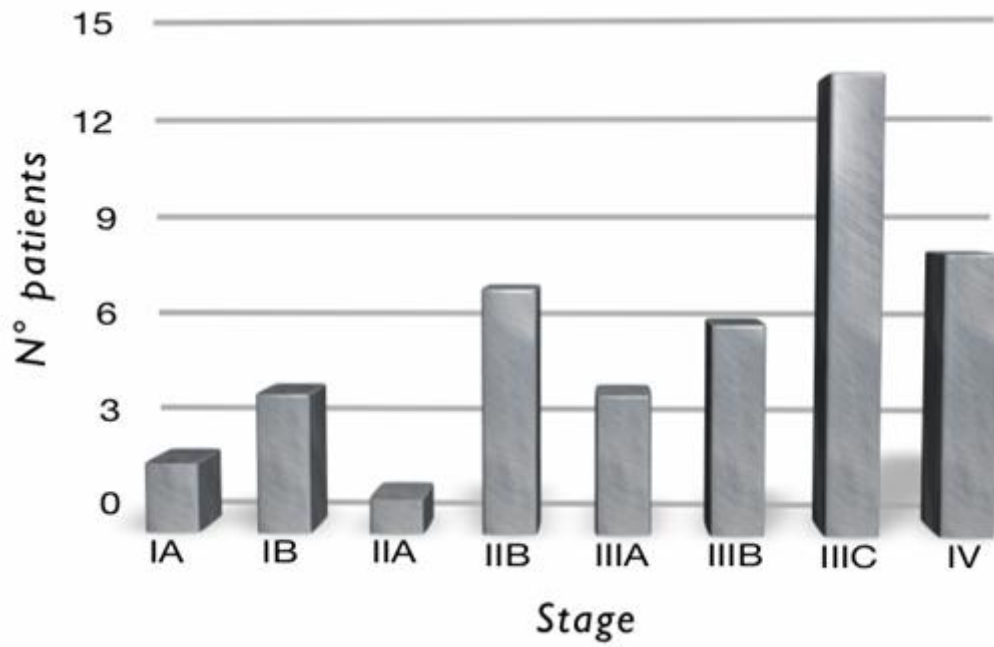
**Table 6.** Univariate and multivariate survival analysis using the Cox regression model ( $n=45$ , deaths=34).

	UNIVARIATE			MULTIVARIATE		
	HR	IC 95%	P	HR**	IC 95%	P
VEGF $\geq$ 30	0.35	0.17 - 0.74	0.006*	0.37	0.17 - 0.79	0.010*
Age $\geq$ 60 Years	1.31	0.62 - 2.76	0.463	1.47	0.69 - 3.10	0.313
Sex Male	0.85	0.39 - 1.82	0.681	–	–	–
T3 and T4	2.86	0.86 - 9.47	0.084	–	–	–
Lymph Nodes+	2.42	1.07 - 5.44	0.033*	–	–	–
Borrmann diffuse	1.61	0.79 - 3.30	0.186	–	–	–
Lauren diffuse	1.89	0.93 - 3.83	0.075	1.04	0.34 - 3.18	0.945
Tumor size $>5$	1.30	0.63 - 2.68	0,476	–	–	–
Undifferentiated	2.65	1.31 - 5.36	0,007*	2,51	0,81 a 7,71	0,107

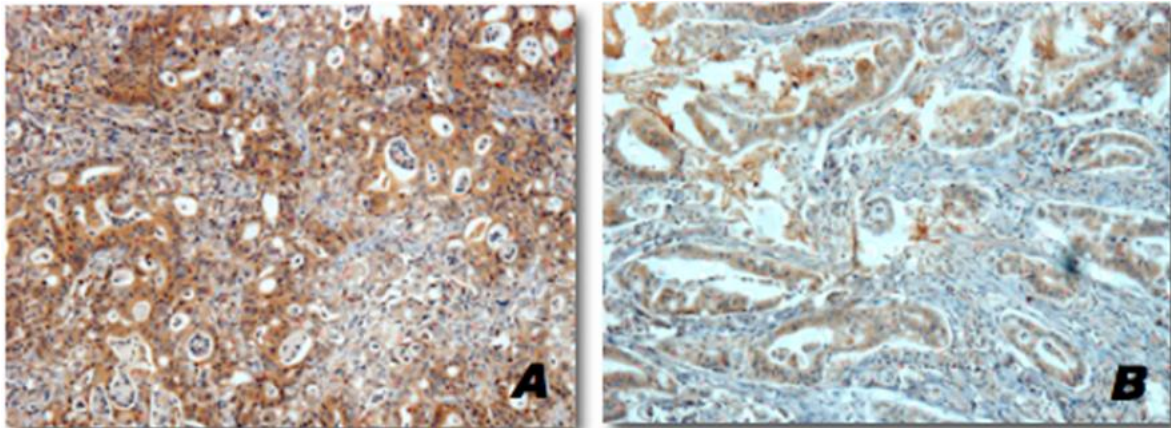
\*Statistically significant at  $p < 0.05$ .

HR: hazard ratio, unadjusted; CI: confidence interval; p: statistical significance;

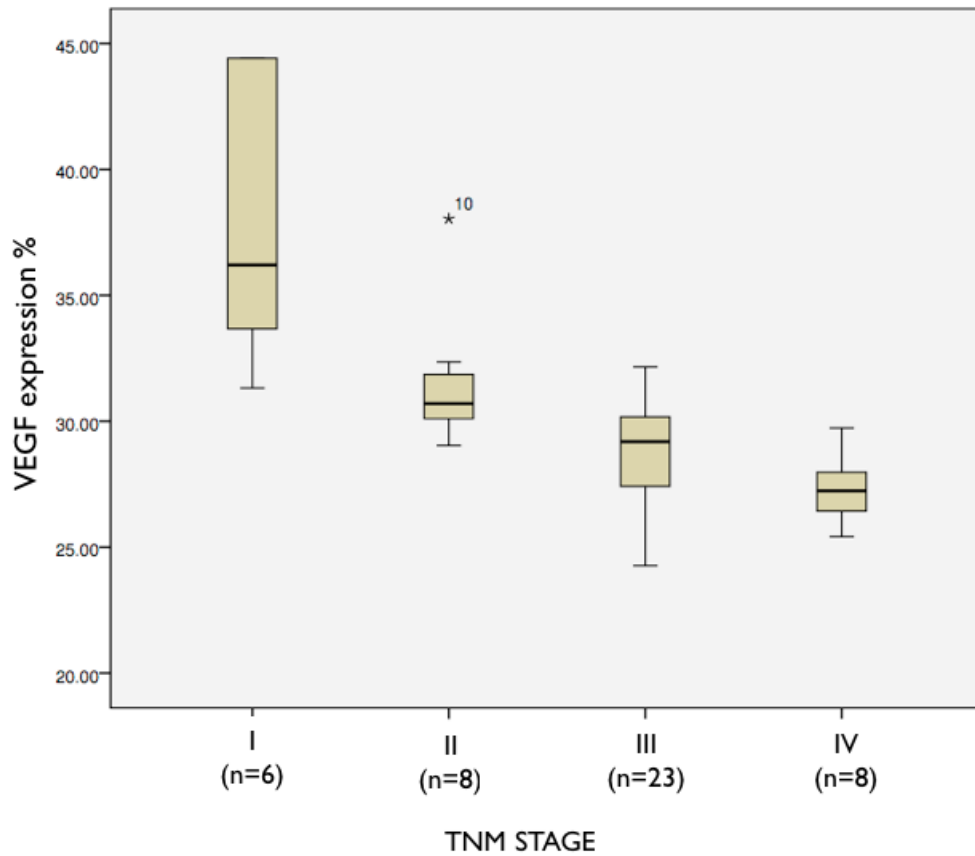
\*\*HR: hazard ratio, adjusted using the Cox proportional hazards regression model with the selected factors; VEGF: vascular endothelial growth factor.



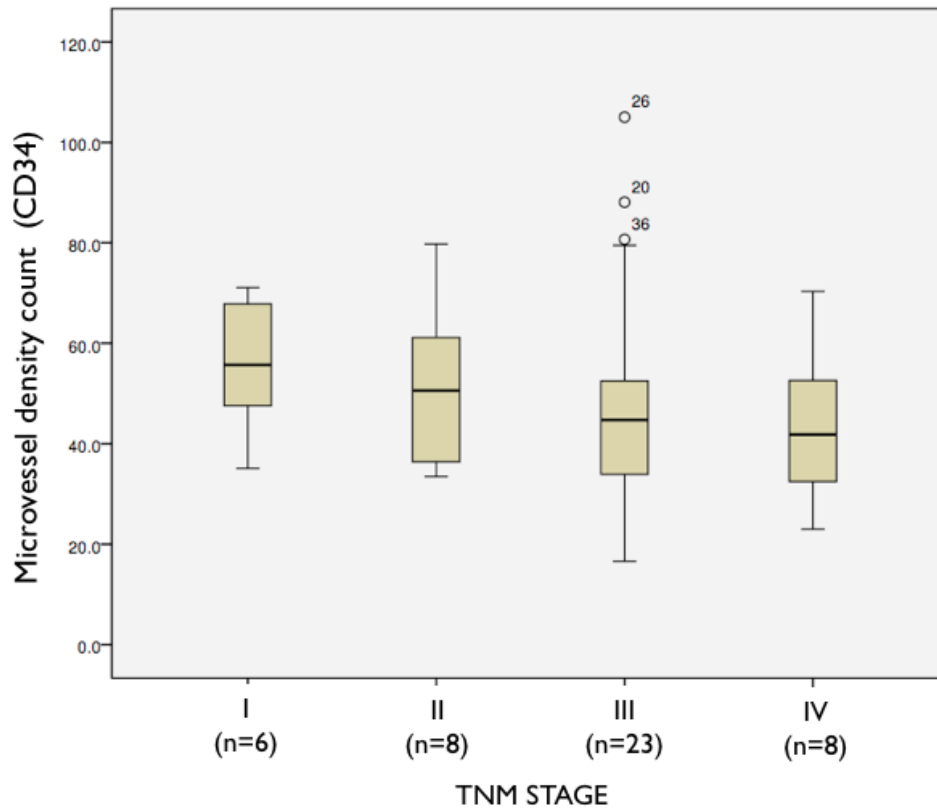
**Figure 1** - Frequency of patients in each pathologic TNM stage.



**Figure 2** - Gastric adenocarcinoma photomicrograph (400 X). Immunohistochemical analysis of VEGF expression (brown staining) with a score  $\geq 30\%$  (A) and  $< 30\%$  (B).

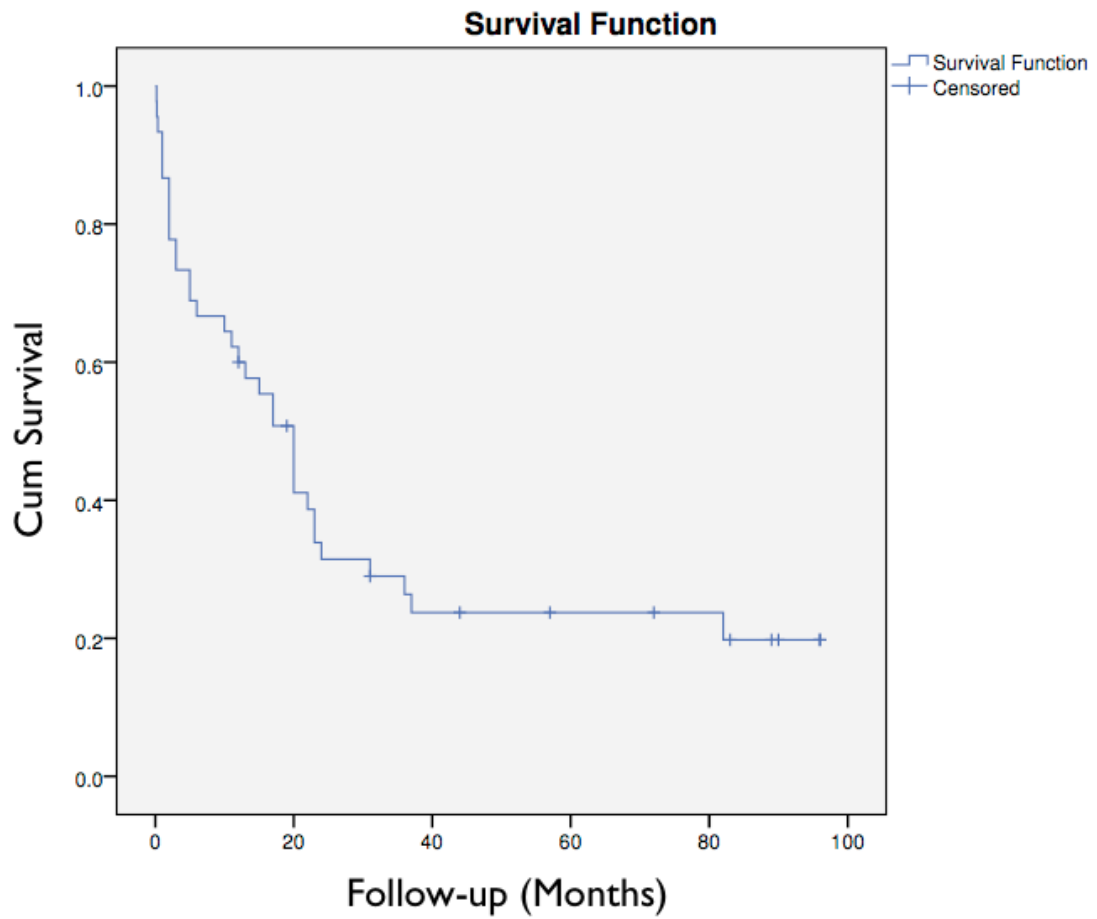


**Figure 3** – Correlation between the VEGF expression level and the pathologic TNM stage.

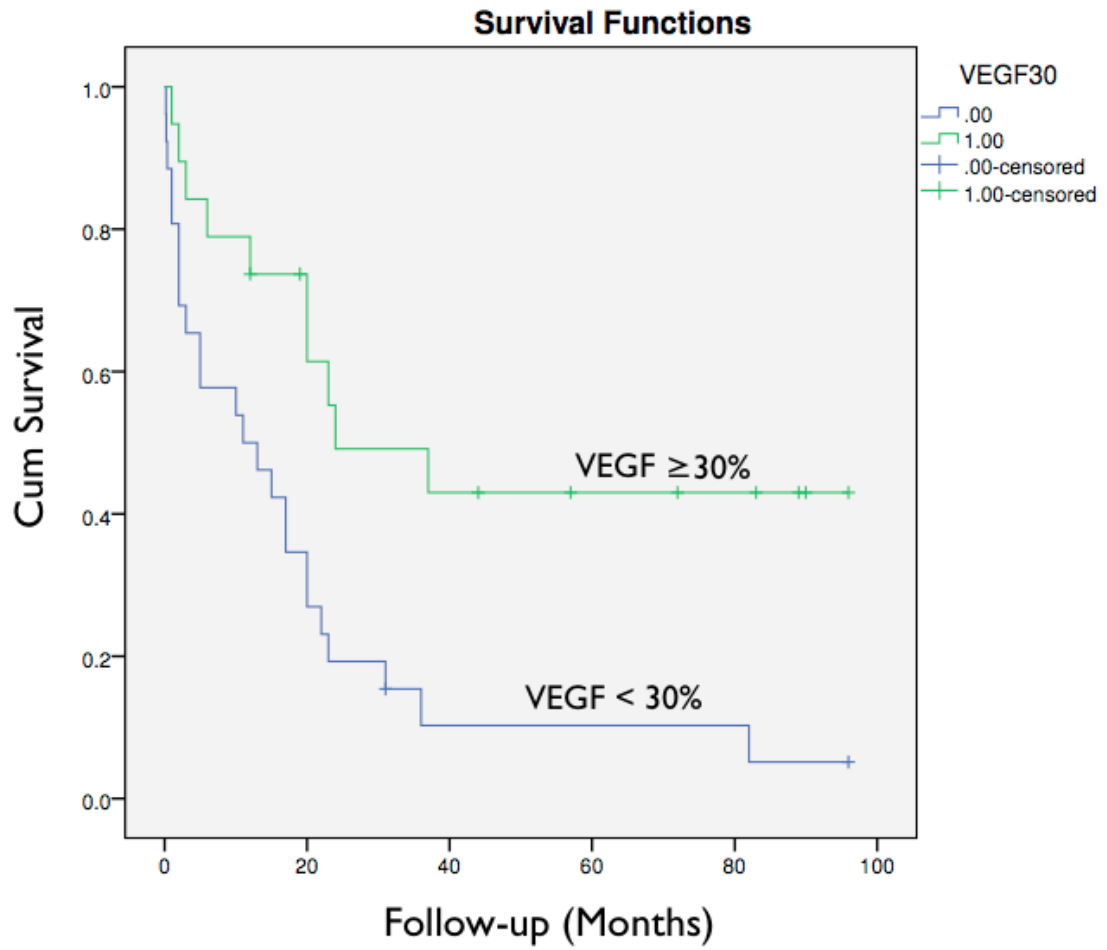


**Figure 4** – Correlation between the microvessel density and the pathologic TNM stage.





**Figure 5** - Overall survival curve (Kaplan-Meier).



**Figure 6** - Survival curve (Kaplan-Meier) in relation to VEGF expression.

## ANEXO B - Certificado de tradução



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

### EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

STAGING AND SURVIVAL IN GASTRIC CANCER: ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF-A)

Authors:

Luciano Silveira Effler, Luiz Felipe Forgiarini, Marcelo Garcia Toneto, Norma Possa Marroni

Date Issued:

January 6, 2012

Certificate Verification Key:

FD0F-5EE0-885D-B8B9-EF55



This certificate may be verified at [www.journalexperts.com/certificate](http://www.journalexperts.com/certificate). This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at [support@journalexperts.com](mailto:support@journalexperts.com).

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit [www.journalexperts.com](http://www.journalexperts.com).

## ANEXO C – Carta de submissão do artigo

**Digestive Diseases and Sciences**  
**STAGING AND SURVIVAL IN GASTRIC CANCER: ROLE OF VASCULAR**  
**ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF-A)**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	STAGING AND SURVIVAL IN GASTRIC CANCER: ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF-A)
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	VEGF-A; Angiogenesis; Staging; Prognosis; Gastric cancer.
<b>Corresponding Author:</b>	Luciano Eifler UFRGS - HCPA Porto Alegre, BRAZIL
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	UFRGS - HCPA
<b>First Author:</b>	Luciano Eifler
<b>Order of Authors:</b>	Luciano Eifler Luiz Felipe Forgiarini, Fellow Master Degree Marcelo Garcia Toneto, PhD Norma Possa Marroni, PhD

**Date:** Jan 14, 2012  
**To:** "Luciano Eifler" eifler@terra.com.br  
**From:** "DDS Editorial Office" dds.journal@gmail.com  
**Subject:** Thank you for your submission

Dear Luciano Eifler:

Thank you for submitting your manuscript "STAGING AND SURVIVAL IN GASTRIC CANCER: ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF-A)" to Digestive Diseases and Sciences. Your manuscript will be assigned to an editor and given a manuscript number within the next 48 hours.

With kind regards,

Geetha Subramanian  
Springer Journals Editorial Office

**ANEXO D- Produção científica durante a vigência do mestrado**

1º Lugar: Modalidade Oral, Categoria Cirurgia, com o trabalho: "Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no câncer gástrico"  
V Simpósio Sul-Americano do Aparelho Digestivo, 2010.

Eifler, L.S. ; FORGIARINI, L. F. ; TONETO, M. G. ; MARRONI, N. P. . Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no câncer gástrico e sua correlação com o estadiamento da doença. In: 31ª Semana Científica do HCPA, 2011, Porto Alegre / RS. Revista HCPA, 2011.

Eifler, L.S.; FORGIARINI, L. F. ; TONETO, M. G. ; MARRONI, N. P. Evaluation of the immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric cancer. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2011, Rio de Janeiro / RJ. Programa Oficial, 2011.

LICKS, F.; MARQUES, C.; PORAWSKI, M.; HARTMANN, R; Eifler, L.S.; MARRONI, N. P.. A N-Acetilcisteína (NAC) protege o estômago do dano oxidativo em ratos submetidos à ligadura parcial de veia porta. In: XXI Congresso da Associação Latino-Americana para Estudo do Fígado, 2010, Porto Alegre / RS. Annals os Hepatology. México, 2010. v. 9. p. 345-345.

MARQUES, C.; FERRAZ, A.; MARTINS, M. I. M. ; Eifler, L.S. ; MARRONI, N. P. . Modulatory effect of VEGF in NO reease and its route in the development of oxidative stress in Portal hypertension.. In: XXI Congresso da Associação Latino-Americana para Estudo do Fígado, 2010, Porto Alegre / RS. Annals os Hepatology. México, 2010. v. 9. p. 346-346.

Eifler, L.S. ; FORGIARINI, L. F. ; KRETZMANN FILHO, N. A. ; TONETO, M. G. ; MARRONI, N. P. . Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no câncer gástrico: Resultados preliminares. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2010, Águas de Lindóia / SP. Livro de Resumos, 2010.