

EXAMINĂRI PRELIMINARE PRIVIND EXPRESIA FACTORULUI DE CREȘTERE A ENDOTELIULUI VASCULAR (VEGF-A) ÎN CARCINOAMELE GASTRICE

**IOANA HĂLMACIU¹, SIMONA GURZU², M.G. MUREȘAN³, B.A. SUCIU⁴,
KLARA BRÎNZANIUC¹**

1 Departamentul de Anatomie și Embriologie, Universitatea de Medicină și Farmacie,

Târgu Mureș, Romania

2 Departamentul de Patologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Târgu Mureș, Romania

3 Departamentul de Chirurgie, Universitatea de Medicină și

Rezumat

Introducere

Angiogeneza tumorală gastrică este un proces intens studiat dar trialurile clinice recente, care includ și medicamente antiangiogenice, nu demonstrează o creștere semnificativă a supraviețuirii în toate cazurile. Nu există criterii clinico-morfologice precise care să ajute la selectarea cazurilor cu probabilitate crescută de răspuns la aceste terapii. Studiul nostru constituie o etapă incipientă de analiză observațională a expresiei Factorului de Creștere a Endoteliului Vascular (VEGF-A) în carcinoamele gastrice.

Material și metodă

La un lot de 134 de pacienți, diagnosticați cu cancer gastric și supuși intervenției chirurgicale, am urmărit: vârsta, sexul, localizarea neoplasmelor gastrice, aspectul macroscopic, tipul histologic și stadiul pTNM. Dintre acestea, am selectat 19 cazuri în care am analizat imunohistochimic expresia anticorpului anti-VEGF-A, clona VGI LabVision.

Rezultate

În tumorile antrale, VEGF-A a fost intens pozitiv în celulele absorbitive ale glandelor peritumorale metaplazice și în glandele displazice și a scăzut semnificativ în celulele tumorale, independent de alți parametri clinico-patologici. În carcinoamele corpului gastric, mucoasa peritumorală a fost focal pozitivă, fără diferențe de intensitate comparativ cu celulele tumorale. Indiferent de localizare, imunofenotipul angiogenic nu s-a corelat cu nici unul din parametrii clinico-morfologici analizați.

Discuții

Studiul de față demonstrează faptul că VEGF pare să aibă un rol important în procesul de carcinogeneză gastrică, în special în fazele incipiente ale tumorilor localizate antral, dezvoltate pe fondul metaplaziei intestinale.

Concluzii

Studiul nostru arată că tumorile antrale par să aibă un un comportament angiogenic diferit de cele ale corpului gastric dar imunofenotipul angiogenic nu se corelează cu agresivitatea tumorală. VEGF joacă un rol important în primii pași ai

carcinogenezei, în special în ariile cu metaplazie intestinală. Pentru o interpretare corectă a angiogenezei tumorale în carcinoamele gastrice, studii prospective, pe un număr mare de cazuri, sunt necesare.

Cuvinte cheie: Factor de creștere endotelial vascular (VEGF-A), Carcinom gastric, Angiogeneză.

Preliminary results about Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) expression in gastric carcinomas

Abstract

Objective

Angiogenesis in gastric tumor is a widely studied process, but recent clinical trials including anti-angiogenic drugs, do not show in all cases a significant increase in survival. Specific clinical and morphological criteria designed to select the cases with a high probability of response to these therapies are not yet established. Our study represents an early stage of observational analysis of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in gastric carcinomas.

Material and method

The study included 134 patients diagnosed with gastric cancer and who underwent a surgical intervention in order to remove the gastric tumor during 2008 - 2010. In every case there were analyzed: histological type, macroscopic aspect, location of carcinomas in the stomach, and pTNM staging. A number of 19 cases were selected and immunohistochemical examined for the expression of antibody anti-VEGF-A, clone VGI produced by LabVision.

Results

In the cases of antral tumors, VEGF-A highly marked the absorptive cells of metaplastic peritumoral glands and the dysplastic glands, but it significantly decreased in tumor cells, independent of other clinical or pathological parameters.

In the cases of body gastric carcinomas, peritumoral mucosa was focal positive without differences in intensity compared with tumor cells. Angiogenic immunophenotype did not correlate with any of the clinical and morphological parameters analyzed, regardless of location .

Discussions

The present study demonstrates that VEGF appears to have an important role in gastric carcinogenesis, especially in the early stages of antral tumors developed on the background of intestinal metaplasia.

Conclusions

Our study shows that the antral tumors seem to have a different angiogenic behavior from the gastric body tumors but the angiogenic immunophenotype does not correlate with tumor aggressiveness. VEGF plays an important role in early carcinogenesis, especially in areas with intestinal metaplasia. In order to make a proper interpretation of tumor angiogenesis in gastric carcinoma, prospective studies on large numbers of cases are needed.

Keywords: Vascular endothelial growth factor (VEGF-A), Gastric carcinoma, Angiogenesis.

INTRODUCERE

Angiogeneza este procesul de formare a unor vase noi, pornind de la vascularizația preexistentă. De-a lungul timpului, numeroase studii au demonstrat complexitatea și importanța acestui fenomen în procese reparative și tumorale.

Angiogeneza tumorală joacă un rol esențial în creșterea și metastazarea tumorilor maligne [1] și se desfășoară sub influența Factorilor de Creștere a Endoteliului Vascular (VEGF) și receptorilor acestora. Familia VEGF cuprinde 5 membri notați de la A la E, însă cel mai studiat rămâne VEGF-A, un factor proangiogenic, inhibitor al apoptozei [2].

Începând cu anul 2004, tot mai mulți pacienți cu neoplazii în stadiu metastatic au fost incluși în trialuri clinice bazate pe terapie individualizată, care a cuprins și medicamente antiangiogenice [2]. S-a obținut, astfel, creșterea supraviețuirii dar rezultatele nu sunt cele mai încurajatoare.

Trialurile clinice recente includ, în terapia carcinoamelor gastrice, inhibitori tirozin-kinazici, Herceptină, medicamente anti-EGFR dar și substanțe antiangiogenice, anti-VEGF [3,4]. În ciuda terapiei complexe ținute, rata supraviețuirii la 5 ani rămâne în continuare scăzută. Mai mult decât atât, în afara prezenței metastazelor, nu există alte criterii clinico-morfologice care să ajute la aprecierea posibilității răspunsului la terapia anti-VEGF și la creșterea raportului cost-eficiență.

Scopul studiului nostru a fost analiza observațională a expresiei VEGF intra- și peritumorale, în carcinoame gastrice aflate în diferite stadii și grade de diferențiere, ca un prim pas al interpretării morfo-imunohistochimice a procesului de angiogeneză în aceste leziuni.

MATERIALE ȘI METODĂ

În scopul selectării celor mai adecvate cazuri, au fost analizate, retrospectiv, din buletinele histopatologice ale Departamentului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Târgu-Mureș, informațiile clinico-patologice ale unui lot de 134 de pacienți diagnosticați cu carcinoame gastrice, care au fost supuși intervenției chirurgicale în perioada 2008-2010.

Parametrii analizați au fost: sexul, vârsta, localizarea tumorilor, tipul macroscopic, tipul histologic și stadiul tumorii, conform celei de a 7-a ediții AJCC (American Joint Committee on Cancer) a stadializării pTNM, publicată în 2010 [5].

Descrierea macroscopică s-a realizat conform clasificării Borrmann: tipul I (vegetativ), tipul II (ulcerat), tipul III (ulcero-infiltrativ) și tipul IV (infiltrativ difuz).

Pentru tipul histologic am utilizat clasificarea Lauren: adenocarcinom de tip intestinal (bine diferențiat, formator de glande) și carcinom de tip difuz (nediferențiat).

Din cele 134 de cazuri, am ales pentru studiul imunohistochimic, ca primă etapă, 19 cazuri reprezentative, cu tumori în diferite stadii, localizate atât în antru cât și în corpul stomacului, intestinale și difuze. Caracteristicile acestora sunt redată în Tabelul 1. În fiecare dintre cazuri am analizat și expresia VEGF în mucoasa normală, metaplastică sau displazică, adiacentă tumorii.

Pentru efectuarea reacțiilor imunohistochimice, am utilizat anticorpii anti-VEGF-A, clona VG1 și sistemul de lucru EnVision de la LabVision, pe țesuturi fixate în formalină și incluse în parafină. Incubarea s-a făcut în EDTA, pH9, la 100°C, anticorpii primari au fost aplicați 60 de minute iar dezvoltarea s-a efectuat cu soluție DAB (substrate-chromogen solution). Nucleii au fost colorați cu Hematoxilină Mayer.

Cuantificarea expresiei citoplasmice a VEGF a fost efectuată după următoarele criterii: negativ = lipsa expresiei; + = expresie de intensitate slabă, în 20% din celulele tumorale; ++ = expresie de intensitate moderată în 20-50% din celulele tumorale și +++ = expresie intensă în peste 50% din celulele tumorale.

REZULTATE

Date clinico-patologice

Din cei 134 de pacienți incluși în studiu, 73,89% au fost bărbați și 26,11% femei, cu vârsta medie de 68 de ani pentru sexul feminin și 70 de ani pentru sexul masculin.

57,46% din cazuri au fost localizate la nivelul corpului, 32,83% au interesat antrul piloric, 6,71% au

fost difuze și 3% au fost localizate proximal, la mai mult de 5cm distal de joncțiunea eso-gastrică.

Cele mai multe tumori au fost tipul III Borrmann, ulcero-infiltrative (71,64%), urmat de tipul IV infiltrativ-difuz (15,67%), tipul II ulcerat (9,7%) și tipul I vegetant (2,99%).

S-a observat predominanța tipului intestinal (71,66%), în defavoarea celui difuz (28,34%).

În ceea ce privește stadiul tumoral, au predominat cazurile avansate pT4 (55,97%) și pT3 (32,08%), respectiv pN3 (46,26%), cele mai multe cazuri fiind încadrate în stadiul IIIC (26,86%), urmat de stadiul IIIB (16,41%), și stadiul IV (14,94%).

Rezultate observaționale imunohistochimice

În cele 19 cazuri analizate, nu am observat diferențe semnificative între expresia VEGF și vârsta, sexul sau aspectul macroscopic al tumorii.

De asemenea, stadiul tumorii nu pare să influențeze imunofenotipul angiogenic. Astfel, tumora in situ (cazul 14) a fost VEGF slab pozitivă (+) dar și cazurile din stadiul IV (numărul 7 și 18) au prezentat aceeași expresie (+). Au fost, de asemenea, tumori în stadiul IIIB negative (cazul numărul 15). Caracteristicile cazurilor incluse în studiu pot fi observate în Tabelul 1.

Din cele patru carcinoame difuze (cazurile 3,5,14,19), două au fost VEGF negative, unul slab pozitiv (+) și unul a prezentat intensitate VEGF moderată (++), fără diferențe semnificative față de adenocarcinoamele intestinale, deși patru dintre acestea au fost intens pozitive (+++).

Nr. caz	Sex	Vf	Localizare	Aspect macroscopic	Aspect microscopic	pT	pN	ST	Expresie VEGF	Invazie limfatică	Invazie vasculară
1.	M	>65	Antru	Tip III	Intestinal	T4a	N1	IIIA	+	Da	Da
2.	M	>65	Difuz	Tip III	Intestinal	T3	N2	IIIA	+	Da	Da
3.	M	>65	Antru	Tip III	Difuz	T3	N1	IIB	-	Da	Da
4.	M	>65	Corp	Tip II	Intestinal	T2	N0	IB	+++	Nu	Da
5.	M	<65	Difuz	Tip III	Difuz	T4a	N3	IV	++	Da	Da
6.	M	>65	Antru	Tip I	Intestinal	T3	N2	IIIA	+	Da	Da
7.	M	>65	Antru	Tip I	Intestinal	T4b	N1	IV	+	Da	Da
8.	M	<65	Corp	Tip III	Intestinal	T3	N0	IIA	-	Nu	Da
9.	F	<65	Corp	Tip III	Intestinal	T3	N3	IIIB	++	Da	Da
10.	M	>65	Corp	Tip III	Intestinal	T3	N1	IIB	++	Da	Da
11.	M	<65	Corp	Tip III	Intestinal	T4a	N3	IV	++	Da	Da
12.	M	>65	Corp	Tip III	Intestinal	T4a	N1	IIIB	+++	Da	Da
13.	F	>65	Corp	Tip III	Intestinal	T3	N0	IIA	+++	Nu	Da
14.	M	<65	Antru	Tip IV	Difuz	Tis	N0	0	+	Nu	Nu
15.	M	>65	Corp	Tip III	Intestinal	T3	N3	IIIB	-	Da	Da
16.	F	<65	Corp	Tip III	Intestinal	T4a	N0	IIB	++	Da	Da
17.	M	>65	Corp	Tip III	Intestinal	T2	N3	IIIA	+++	Da	Da
18.	F	>65	Antru	Tip III	Intestinal	T3	N3	IV	+	Da	Da
19.	M	>65	Antru	Tip I	Difuz	T1b	N0	IA	-	Nu	Nu

Tabel I. Caracteristici clinico-patologice ale pacienților incluși în studiu, corelate cu expresia anticorpului anti-VEGF-A

Clasificarea Borrmann: tipul I (polipoid), tipul II (excavat), tipul III (ulcero-infiltrativ), tipul IV (infiltrativ difuz)

Clasificarea Lauren: carcinom de tip intestinal (bine diferențiat), carcinomul de tip difuz (nediferențiat).

M = Sexul masculin, F = sexul feminin, Vf = vârstă, pT = gradul invaziei tumorale, pN = numărul de limfonoduli invadați, ST = stadiul pTNM

În ceea ce privește localizarea tumorilor, se pare că cele antrale au un comportament angiogenic diferit de

carcinoamele corpului gastric. Deși mucoasa normală a corpului, peritumoral, a fost focal pozitivă, în

glandele din mucoasa antrală cu metaplazie intestinală celulele absorbitive au fost intens pozitive la VEGF (+++) iar cele caliciforme au fost VEGF negative (Fig. 1). De asemenea, glandele cu displazie de la nivel antral au fost intens pozitive (+++).

Interesant este faptul că în tumoră, indiferent de parametrii clinico-patologici, intensitatea VEGF a scăzut foarte mult, comparativ cu ariile metaplazice și displazice. Astfel, din cele șapte tumori antrale, două au fost negative și celelalte au fost doar slab pozitive (+). Tipul difuz a păstrat expresia VEGF în stadiul în situ (cazul 14, Fig. 2) dar trecerea în stadiul de carcinom invaziv (cazul 3) a dus la scăderea totală a expresiei VEGF.

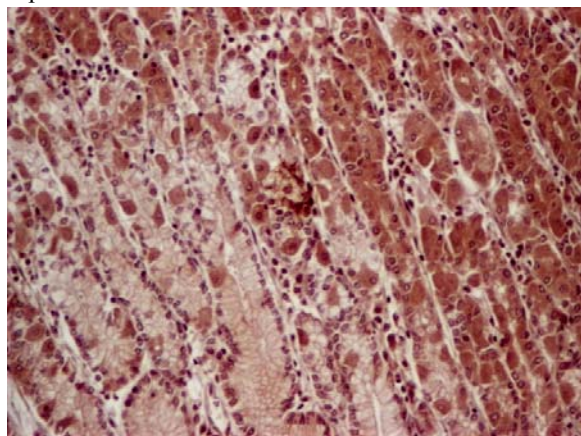


Fig. 1. Intensitate crescută a anticorpului anti-VEGF-A în celulele absorbitive metaplazice (stânga) și glandele displazice antrale (dreapta). Ob. 10x

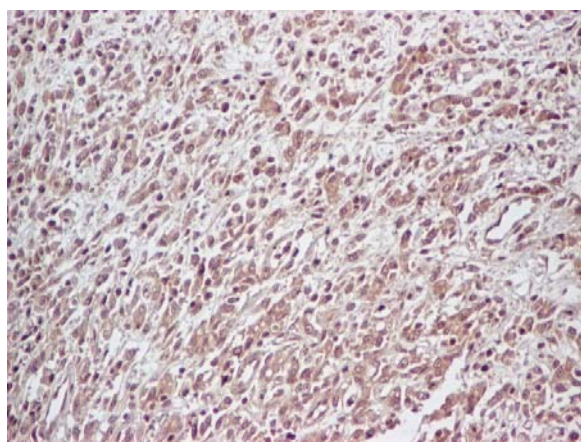


Fig. 2. Intensitate minimă (+) a anticorpului anti-VEGF-A în celulele tumorale ale unui carcinom difuz in situ (cazul 14). Ob. 10x

Raportat la invazia angio-limfatică, doar două cazuri din 19 au fost fără invazie (unul era in situ, celălalt în

stadiu IA) ambele fiind carcinoame difuze. Expresia VEGF a fost slab pozitivă în stadiul 0 (cazul 14) și absentă în stadiul IA (cazul 19). Întrucât majoritatea cazurilor prezentau deja invazie angio-limfatică, nu se poate preciza legătura dintre cei doi parametri.

Discuții

Datele din literatură arată că prognosticul în cazul neoplasmelor localizate în 1/3 proximală gastrică este rezervat, comparativ cu cele localizate distal. Tumorile cu localizare proximală înregistrează o creștere, dezvoltare și metastazare limfonodulară mai rapidă în raport cu cele localizate distal. Prognosticul cel mai nefavorabil, îl dețin pacienții cu infiltrare tumorală difuză a stomacului [6].

Deși se cunoaște agresivitatea crescută a tipului difuz comparativ cu cel intestinal, se pare că fenotipul angiogenic nu se corelează cu agresivitatea tumorală. Astfel, nici unul din cele patru carcinoame difuze nu a prezentat intensitate VEGF maximă (+++). Două au fost negative, unul slab pozitiv, doar unul prezentând intensitate ++. Trebuie menționat, însă, că din cele patru cazuri, trei au fost diagnosticate în stadii incipiente iar cel ++ a fost în stadiul IV. Este posibil ca expresia VEGF în formele difuze să se coreleze cu stadiul tumorii.

Studiul de față demonstrează faptul că VEGF pare să aibă un rol important în procesul de carcinogeneză gastrică, în special în fazele incipiente ale tumorilor localizate antral, dezvoltate pe fondul metaplaziei intestinale. Astfel, expresia intensă în celulele absorbitive și în glandele displazice, corelată cu scăderea marcată dar neuniformă a intensității VEGF în celule tumorale, arată că în fazele de carcinom invaziv angiogeneza gastrică pare să aibă un caracter oscilant, independent de stadiul tumoral.

Raica și colaboratorii, pe un studiu realizat pe 80 de cazuri de neoplasm gastric de tip intestinal, au evidențiat, de asemenea, pozitivitatea VEGF în mucoasa cu metaplazie intestinală și în glandele gastrice antrale de aspect normal dar localizate în vecinătatea tumorii [7].

Nu am găsit date care să confirme scăderea expresiei VEGF în celulele tumorale, comparativ cu glandele metaplazice și/sau displazice nici studii care să compare expresia VEGF în formele microscopice difuze cu ale mucoasei peritumorale.

Întrucât pozitivitatea VEGF pare să influențeze complianța tumorii la tratamentul chimioterapic cu cisplatin [8], iar terapia antiangiogenică tinde să fie

implementată pe scară tot mai largă în carcinomul gastric, studii ulterioare, pe un număr mare de cazuri, sunt necesare pentru caracterizarea imunofenotipului angiogenic gastric și a selectării cazurilor care ar putea răspunde la această terapie.

Concluzii

După prima evaluare se pare că VEGF joacă un rol important în primii pași ai carcinogenezei, în special în ariile cu metaplazie intestinală. Pe parcursul transformării tumorale, în aceste arii, intensitatea sa scade.

În corpul stomacului, imunofenotipul angiogenic este greu de apreciat, acesta necorelându-se cu alți parametri clinico-patologici dar intensitatea sa ar putea indica posibilitatea răspunsului sau rezistenței la terapia antiangiogenică.

Pentru o interpretare corectă a angiogenezei tumorale în carcinoamele gastrice, studii extinse, pe un număr mare de cazuri, sunt necesare. De asemenea, corelarea cu densitatea microvasculară CD31 și CD105 și nivelul seric VEGF-A sunt necesare pentru o terapie individualizată eficientă.

Mulțumiri

Această lucrare a fost parțial finanțată de către CNCIS, proiect PN II - PD, 504/2010 și de Sectoral Operational Programme Human Resources Development, din surse europene și ale Guvernului României, contract POSDRU/89/1.5/S/60782.

Bibliografie

1. Kerbel RS, Ellis LM. Angiogenesis. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA (eds) DeVita Hellman, and Rosenberg's Cancer- Principles and Practice of Oncology, Philadelphia, 8th edition, Wolter Kluwer/Lippincott Williams& Wilkins, 2008, 103-118
2. Miron L, Gafton B, Marinca M. Angiogeneza tumorală- implicații în terapia cancerelor. Jurnalul de chirurgie Iași 2010;6:104-111
3. Daniela Cornelia Lazăr. Teză de Doctorat. Studiu clinico-morfologic și evolutiv-prognostic al cancerului gastric de în început și avansat. Timișoara 2007, 218-220
4. Milkv P. Multimodal therapy of gastric cancer. Dig Dis. 2010;28:615-618
5. American joint committee on cancer. Stomach. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al (eds) AJCC Cancer Staging Handbook, Seventh Edition, Springer, 2010, 145-152
6. Michelassi F, Takanishi DM, Pantalone D, Hart J, Chappell R, Block GE. Analysis of clinicopathologic prognostic features in patients with gastric adenocarcinoma. Surgery 1994;116: 804-810
7. Raica M, Mogoantă L, Anca Maria Cîmpean et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in intestinal type gastric carcinoma. Romanian Journal of Morphology and Embryology 2008;49:37-42
8. Boku N, Ohtsu A, Nagashima F, Shirao K, Koizumi W. Relationship between expression of vascular endothelial growth factor in tumor tissue from gastric cancers and chemotherapy effects: comparison between S-1 alone and the combination of S-1 plus CDDP. Jpn J Clin Oncol 2007;37:509-514