

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES  
IMUNOISTOQUÍMICOS RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE  
(VEGF), LINFANGIOGÊNESE (D2-40) E INFLAMAÇÃO (COX-2)  
EM PACIENTES PORTADORES DE ADENOCARCINOMA  
PANCREÁTICO SUBMETIDOS A TRATAMENTO CIRÚRGICO  
COM INTUITO CURATIVO**

**ALESSANDRO LANDSKRON DINIZ**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. André Luis Montagnini**

**São Paulo**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Diniz, Alessandro Landskron

**Análise da expressão de marcadores imunoistoquímicos relacionados à angiogênese (VEGF), linfangiogênese (D2-40) e inflamação (COX-2) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo** / Alessandro Landskron Diniz – São Paulo, 2008.

57p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: André Luis Montagnini

Descritores: 1. ADENOCARCINOMA DUCTAL DO PÂNCREAS. 2. VEGF-1. 3. CICLOOXIGENASE 2. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA 5. PROGNOSTICO. 6. CIRURGIA. 7. ANÁLISE SERIAL DE TECIDOS.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Petrônio e Leci, pelo carinho e amor dedicados a mim durante toda minha vida, e pela oportunidade de permitir buscar meus sonhos.

Ao meu irmão Adriano, pelo companheirismo e amizade, e pelo exemplo de competência como médico.

## **AGREDECIMENTOS**

Ao Dr. André Montagnini, pelas orientações e ensinamentos durante minha formação médica, e pela amizade e companheirismo.

A Dra. Renata Coudry pelo auxílio fundamental na análise histopatológica da casuística estudada e grande espírito de colaboração.

Ao Drs. Venâncio Avancini e Dr. Fernando Soares pela ajuda na elaboração e execução desse estudo, bem como pelo espírito de colaboração inter-institucional.

Ao Dr. Marcos Perini, pela ajuda na execução do trabalho e pelo companheirismo e amizade.

Aos Drs. Felipe Coimbra, Paulo Herman, Marcel Autram e Rubens Sallum, amigos e colegas de departamento de cirurgia abdominal, pelas orientações ao longo de minha formação e pela amizade e companheirismo.

Ao acadêmico Gunter Krähenbühl pela ajuda no levantamento dos dados do prontuário.

Ao Dr. Wilson Jr. pelo auxílio na análise estatística e pela amizade.

A todos os funcionários do SAME e do departamento de Anatomia Patológica do hospital AC Camargo, que contribuíram para execução desse trabalho.

A toda a equipe da biblioteca do Hospital A.C. Camargo pelos frequentes auxílios e orientação, desde o início do curso, até a formatação da tese.

## RESUMO

Diniz AL. **Análise da expressão de marcadores imunoistoquímicos relacionados à angiogênese (VEGF), linfangiogênese (D2-40) e inflamação (COX-2) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo.** São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O adenocarcinoma de pâncreas, constitui uma das neoplasias mais letais do trato gastrointestinal. Nos últimos anos, pouco avanço ocorreu, no que diz respeito a melhora da sobrevida dos pacientes tratados por essa doença. Dessa forma justifica-se o estudo de potenciais mecanismos de desenvolvimento e evolução dessa doença para possíveis alvos terapêuticos. Este estudo avaliou de forma retrospectiva 76 pacientes operados por adenocarcinoma de pâncreas com intuito curativo. Análise do impacto na sobrevida de dados clínicos, demográficos, e patológicos como: idade, sexo, CA19.9, estadiamento, invasão perineural e grau de diferenciação com sobrevida. Análise de expressão de VEGF, COX-2 e D2-40 por meio do método de tissue array, de forma automatizada, com o programa ACIS, e interpretação desses resultados com ênfase em sobrevida e impacto nas variáveis histopatológicas. A expressão de COX-2 esteve relacionada de forma significativa com o grau de diferenciação tumoral ( $p=0,03$ ). A expressão de COX-2 apresentou uma tendência a associação com prognóstico, porém sem atingir significância estatística. A VEGF não apresentou impacto na sobrevida, bem como não esteve relacionado a nenhuma das variáveis histopatológicas. Invasão perineural e nível de CA19.9, foram fatores independentes de impacto na sobrevivência.

## SUMMARY

Diniz, AL. **[Analisis of the expression of imunohistochemistry markers: VEGF, D2-40 and COX- 2, by tissue array in patients with pancreatic adenocarcinoma, submitted to surgical treatment with curative intend.]**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Pancreatic adenocarcinoma, is one of the most lethal cancers of the gastrointestinal tract. In recent years, little progress has occurred, with respect to survival of patients treated for this disease. In order to achieve more information of the biology of this disease, this study is justified to evaluate potential mechanisms of the pancreatic cancer development. This might help in the future, to achieve new therapeutic targets. This study assessed retrospectively 76 patients operated with curative intent, with the diagnosis of adenocarcinoma of the pancreas. Analysis of the impact on survival of clinical data, including: age, sex, CA19.9, staging, and pathological data, such as: vascular invasion, tumor size, perineural invasion and degree of differentiation. Analysis of expression of VEGF, COX-2 and D2-40 through the method of tissue array, trough an automated manner, with the ACIS program. And interpretation of these results with emphasis on survival and impact on histopathological variables. The expression of COX-2 was related to any significant degree of differentiation with the tumor ( $p = 0.03$ ). Expression of COX-2 showed a trend association with the prognosis, but not reach statistical significance. VEGF did not show an impact on survival, and was not related to any of the histopathological variables. Perineural invasion and level of CA19.9 were independent of factors impact on survival.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                  |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Representação esquemática da punção e transferência das áreas selecionadas do bloco doador para o bloco receptor- <i>tissue microarray</i> ..... | 16 |
| <b>Figura 2</b>  | Aspecto das lâminas receptoras (cada “core” corresponde a um caso ou tecido a ser estudado) .....                                                | 17 |
| <b>Figura 3</b>  | Aspecto do <i>lay out</i> da software utilizado, em detalhe a marcação das áreas de interesse(focos de neoplasia).....                           | 19 |
| <b>Figura 4</b>  | Gráfico da sobrevida global.....                                                                                                                 | 25 |
| <b>Figura 5</b>  | Gráfico da correlação de sexo e sobrevida.....                                                                                                   | 26 |
| <b>Figura 6</b>  | Gráfico da correlação entre nível de bilirrubina e sobrevida....                                                                                 | 26 |
| <b>Figura 7</b>  | Gráfico da correlação entre grau de diferenciação e sobrevida.....                                                                               | 27 |
| <b>Figura 8</b>  | Gráfico da correlação entre Invasão perineural e sobrevida....                                                                                   | 27 |
| <b>Figura 9</b>  | Gráfico da correlação entre perda de peso e sobrevida.....                                                                                       | 28 |
| <b>Figura 10</b> | Gráfico da correlação entre o tamanho do tumor e sobrevida.                                                                                      | 28 |
| <b>Figura 11</b> | Gráfico da correlação entre glicemia e sobrevida.....                                                                                            | 29 |
| <b>Figura 12</b> | Gráfico da correlação entre estadiamento e sobrevida.....                                                                                        | 29 |
| <b>Figura 13</b> | Gráfico da representação gráfica da distribuição das médias de expressão de COX- 2 nos diferentes tecidos.(p= NS).....                           | 32 |
| <b>Figura 14</b> | Expressão moderada de COX- 2 no tecido tumoral.....                                                                                              | 32 |
| <b>Figura 15</b> | Expressão forte de COX- 2 em adenocarcinoma de pâncreas.....                                                                                     | 33 |

|                  |                                                                                             |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 16</b> | Expressão fraca de COX- 2 em adenocarcinoma de pâncreas.....                                | 33 |
| <b>Figura 17</b> | Expressão de COX-2 em metástase linfonodal.....                                             | 34 |
| <b>Figura 18</b> | Gráfico da sobrevida e expressão de COX- 2.....                                             | 35 |
| <b>Figura 19</b> | Expressão citoplasmática forte de VEGF em Adenocarcinoma de pâncreas.....                   | 36 |
| <b>Figura 20</b> | Expressão fraca citoplasmática de VEGF em adenocarcinoma de pâncreas.....                   | 37 |
| <b>Figura 21</b> | Expressão moderada de VEGF em adenocarcinoma de pâncreas.....                               | 37 |
| <b>Figura 22</b> | Expressão de VEGF em linfonodo metastático.....                                             | 38 |
| <b>Figura 23</b> | Gráfico da distribuição das médias de expressão de VEGF-1 nos diferentes tecidos(p=NS)..... | 38 |
| <b>Figura 24</b> | Gráfico da correlação entre expressão de VEGF e sobrevida.                                  | 39 |
| <b>Figura 25</b> | Expressão de D2-40 no tecido tumoral (marcador corando tecidos de forma desorganizada.....  | 42 |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|                  |                                                                                                                           |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Resultados de sobrevida dos melhores braços dos principais ensaios clínicos randomizados sobre tratamento multimodal..... | 4  |
| <b>Tabela 2</b>  | Resultados das categorias demográficas na população estudada.....                                                         | 21 |
| <b>Tabela 3</b>  | Descrição de variáveis clínicas e laboratoriais.....                                                                      | 22 |
| <b>Tabela 4</b>  | Distribuição dos pacientes estudados por estágio.....                                                                     | 23 |
| <b>Tabela 5</b>  | Descrição dos resultados histopatológicos na população estudada.....                                                      | 24 |
| <b>Tabela 6</b>  | Resultados análise multivariada.....                                                                                      | 30 |
| <b>Tabela 7</b>  | Variação da expressão do marcador COX- 2 nos diferentes tecidos.(P=NS) .....                                              | 31 |
| <b>Tabela 8</b>  | Variação da expressão do marcador VEGF-1 nos diferentes tecidos.(P=NS) .....                                              | 36 |
| <b>Tabela 9</b>  | Variáveis histopatológica versus expressão de COX-2.....                                                                  | 40 |
| <b>Tabela 10</b> | VEGF versus variáveis histopatológicas.....                                                                               | 41 |
| <b>Quadro 1</b>  | Estadiamento patológico TNM.....                                                                                          | 13 |
| <b>Quadro 2</b>  | Estadiamento clínico para adenocarcinoma do pâncreas segundo a AJCC (UICC).....                                           | 14 |
| <b>Quadro 3</b>  | Critérios de classificação de grau de diferenciação.....                                                                  | 15 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |                                                |
|--------------|------------------------------------------------|
| <b>AINES</b> | Anti- inflamatórios não esteroidais            |
| <b>AMS</b>   | Artéria Mesentérica Superior                   |
| <b>CaPa</b>  | Câncer de Pâncreas                             |
| <b>COX-2</b> | Ciclo- oxigenase 2                             |
| <b>DPT</b>   | Duodenopancreatectomia                         |
| <b>ESPAC</b> | Grupo Europeu de Estudos do Câncer do Pâncreas |
| <b>GDP</b>   | Gastroduodenopancreatectomia                   |
| <b>IC</b>    | Intervalo de confiança                         |
| <b>N</b>     | Número de pacientes                            |
| <b>OMS</b>   | Organização Mundial da Saúde                   |
| <b>OR</b>    | Odds Ratio                                     |
| <b>p</b>     | Número de significância estatística            |
| <b>PANIN</b> | Neoplasia Intraepitelial Pancreática           |
| <b>PCC</b>   | Pancreatectomia Corpo Caudal                   |
| <b>po</b>    | Dia de pós- operatório                         |
| <b>R0</b>    | Ressecção sem doença microscópica residual     |
| <b>R1</b>    | Ressecção com doença microscópica residual     |
| <b>R2</b>    | Ressecção com doença macroscópica residual     |
| <b>TC</b>    | Tronco Celíaco                                 |
| <b>TMA</b>   | Tissue micro array                             |
| <b>UICC</b>  | União internacional contra o câncer            |
| <b>VEGF</b>  | <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>       |

## LISTA DE SIMBOLOS

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| <b>%</b>    | per cento           |
| <b>Cm</b>   | centímetros         |
| <b>m</b>    | meses               |
| <b>N</b>    | número de pacientes |
| <b>&lt;</b> | menor que           |
| <b>&gt;</b> | maior que           |
| <b>=</b>    | igual a             |
| <b>min</b>  | minutos             |
| <b>ng</b>   | nanogramas          |
| <b>U</b>    | unidades            |
| <b>ml</b>   | mililitros          |

# ÍNDICE

|          |                                                                                                          |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Papel da angiogênese no crescimento local e sistêmico do tumor .....                                     | 4         |
| 1.2      | Papel da linfo-angiogênese .....                                                                         | 7         |
| 1.3      | Papel da ciclo-oxigenase 2.....                                                                          | 9         |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                   | <b>10</b> |
| <b>3</b> | <b>PACIENTES E MÉTODOS.....</b>                                                                          | <b>11</b> |
| 3.1      | Crterios de incluso .....                                                                                | 11        |
| 3.2      | Crterios de exclusão .....                                                                               | 12        |
| 3.3      | Análise de dados demográficos e clínicos.....                                                            | 12        |
| 3.4      | Análise de dados de patologia clínica .....                                                              | 12        |
| 3.5      | Consentimento da comissão de ética e pesquisa.....                                                       | 13        |
| 3.6      | Estadiamento anatomo patológico .....                                                                    | 13        |
| 3.7      | Confirmação do diagnóstico histopatológico e avaliação de grau<br>de diferenciação .....                 | 14        |
| 3.8      | Construção do “Tissue Microarray” (TMA).....                                                             | 16        |
| 3.9      | Imunoistoquímica .....                                                                                   | 17        |
| 3.10     | Interpretação das reações imunoistoquímicas .....                                                        | 18        |
| 3.11     | Análise estatística.....                                                                                 | 19        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                   | <b>21</b> |
| 4.1      | Resultados demográficos .....                                                                            | 21        |
| 4.2      | Resultados clínicos: sintomas e patologia clínica.....                                                   | 22        |
| 4.3      | Estadiamento.....                                                                                        | 22        |
| 4.4      | Resultados descritivos de histopatologia na população estudada.....                                      | 23        |
| 4.5      | Análise de resultados das variáveis clínico-patológicas sobre<br>o prognóstico- análise univariada ..... | 24        |

|          |                                                                                                         |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6      | Análise de resultados das variáveis clínicas sobre o prognóstico-análise multivariada .....             | 30        |
| 4.7      | Expressão de COX-2 no adenocarcinoma de pâncreas, tecido normal e metástase linfonodal.....             | 31        |
| 4.8      | Expressão de vgf1 no adecocarcinoma de pâncreas .....                                                   | 35        |
| 4.9      | Estudo da relação entre a expressão dos marcadores COX-2 VEGF-1 com as variáveis histopatológicas ..... | 39        |
| 4.10     | COX- 2 versus variáveis histopatológicas .....                                                          | 40        |
| 4.11     | VEGF-1 versus Variáveis Histopatológicas .....                                                          | 41        |
| 4.12     | Expressão de D2- 40 no adenocarcinoma de pâncreas.....                                                  | 41        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                  | <b>43</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                  | <b>49</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>                                                                 | <b>50</b> |

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Protocolo do levantamento retrospectivo dos dados

**Anexo 2** Carta de aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

## 1 INTRODUÇÃO

O pâncreas é um órgão de origem endodérmica, que apresenta funções extremamente importantes em relação a digestão de proteínas e regulação de glicose. O pâncreas exócrino (que constitui 80% do seu volume) é composto de uma rede ductal de glândulas acinares e ductais. As células acinares produzem enzimas digestivas que são liberados em última instância no trato gastrointestinal, em resposta a estímulos do estômago e duodeno.

O pâncreas endócrino regula o metabolismo da glicose, por meio da secreção de hormônios na corrente sanguínea (insulina e glucagon). É composto de quatro tipos de células que se agrupam em estruturas chamadas de Ilhotas de Langerhans. Anatomicamente, o pâncreas é dividido em: cabeça, corpo e cauda. A grande maioria dos pacientes operados, apresentam tumores localizados na cabeça pancreática, devido ao acometimento de estruturas que são comprimidas pela lesão, em particular a via biliar intrapancreática. Já os tumores de corpo e cauda do pâncreas, infelizmente, na maioria das vezes são diagnosticados mais tardiamente e associados com doença avançada. Nos tumores localizados o maior determinante de ressecabilidade é a presença ou não de envolvimento vascular dos vasos mesentéricos.

O tecido pancreático pode originar uma série de neoplasias a partir das diferentes células que o constitui. O adenocarcinoma ductal é o tumor

maligno mais comum do pâncreas, chegando a até 85% dos tumores desse órgão, e será o foco desse estudo (HEZEL et al. 2006).

Cerca de 28.000 pessoas morrem a cada ano nos EUA por câncer de pâncreas (SEILER et al. 2005). Embora não seja tão frequente, a alta letalidade dessa doença faz com que ela seja a quinta causa de morte por câncer nos EUA. Os sintomas apresentados pelo tumor, a localização anatômica do pâncreas, a agressividade tumoral e as dificuldades técnicas associadas à ressecção pancreática tornam o diagnóstico e o tratamento desta patologia desafiadores (YEO et al. 1997).

Nos pacientes em que a ressecção tumoral é passível, observa-se que a sobrevida média varia em torno de 15-20%. Os pacientes que apresentam tumores menores de 3 cm, confinados ao pâncreas, sem acometimento linfonodal, e com margens cirúrgicas livres de neoplasias, apresentam as melhores taxas de sobrevida, podendo atingir sobrevida de 40% em 5 anos (COOPERMAN 2001). Entretanto, essa situação na prática clínica é infrequente.

Dentre os fatores estudados que apresentam correlação com a sobrevida dos pacientes submetidos a ressecção, temos os tumores histologicamente indiferenciados, margem de ressecção positiva, acometimento linfonodal pela neoplasia e o diâmetro tumoral (tumores > 3cm apresentam pior prognóstico). Estas variáveis estão associadas à recorrência tumoral e a menor sobrevida dos pacientes operados (YEO et al. 1995 e 1997).

Uma das principais características do câncer do pâncreas é a sua disseminação precoce e a extraordinária capacidade de progressão local. Estes fatores contribuem para o fato de que cerca de 85% dos pacientes portadores de câncer do pâncreas sejam portadores de doença incurável no momento do diagnóstico (DIMAGNO et al. 1999; NEOPTOLEMOS et al. 2001), fazendo que uma minoria dos pacientes diagnosticados por essa doença sejam operados, e desta forma recebendo tratamento inicial com intuito curativo.

O completo mecanismo pelo qual o tumor desenvolve metástases ainda é desconhecido, porém de forma geral pode se dizer que seis mecanismos biológicos, estão associadas às características de malignidade e capacidade de invasão e metastatização dos tumores: auto-suficiência em sinais de crescimento, irreversibilidade aos sinais inibitórios de crescimento, escape da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo invasivo, angiogênese contínua e invasão tecidual (KIM et al. 2002).

Até o momento, o único tratamento para o adenocarcinoma de pâncreas com potencial curativo é a cirurgia com ressecção completa do tumor em monobloco, oferecida somente a pacientes que apresentam tumores localizados e ausência de quaisquer sinais de metástase. No entanto, a cirurgia não oferece melhora na sobrevida e pode causar um aumento da morbidade bem como atrasar o início do tratamento sistêmico paliativo. Sendo assim, vários aspectos do tratamento do câncer de pâncreas foram avaliados até o momento com o intuito de melhorar a sobrevida dos pacientes operados: técnicas cirúrgicas diferentes, associação

de quimioterapia e radioterapia ao tratamento cirúrgico, bem como quimioterapia sistêmica associada. Entretanto pouco se observou ao longo dos anos no que diz respeito a ganho de sobrevida, apesar de todos esses esforços. A Tabela abaixo mostra a sobrevida ao longo do tempo nos principais ensaios clínicos terapêuticos em adenocarcinoma de pâncreas com intuito curativo com varias modalidades terapêuticas, demonstrando que até o momento não houve sucesso mundial no avanço do tratamento contra essa doença extremamente letal.

**Tabela 1** - Resultados de sobrevida dos melhores braços dos principais ensaios clínicos randomizados sobre tratamento multimodal

| <b>Estudo</b>    | <b>N</b> | <b>Sobrevida média (meses)</b> |
|------------------|----------|--------------------------------|
| GITSG (1985)     | 49       | 21                             |
| EORTC 40891 1999 | 114      | 17.1                           |
| ESPAC-1 2004     | 289      | 20.1                           |
| RTOG 9704 2006   | 380      | 20.6                           |
| CONKO 001 20007  | 368      | 22.1                           |
| Evans 2008       | 86       | 34                             |

### **1.1 PAPEL DA ANGIOGÊNESE NO CRESCIMENTO LOCAL E SISTÊMICO DO TUMOR**

A angiogênese tem papel importante na fisiopatologia do carcinoma de pâncreas, pois é essencial para o crescimento dos tumores com mais de 1mm<sup>3</sup> e deve ocorrer para que haja formação de metástases e crescimento tumoral. Ela pode ser mediada por diversas moléculas liberadas pelas

células tumorais e pelo estroma adjacente, principalmente após estímulos como a anóxia (BERGERS et al. 1999; BUBENDORF et al. 2001).

O recrutamento das células endoteliais na angiogênese e na formação de novos vasos depende da quebra na membrana basal que ocorre pela ação de diversos fatores super expressos no câncer do pâncreas, incluindo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), beta-FGF, angenina, membros da família do TGF e EGF, e de interleucina-8 (IL-8). Alguns destes fatores são super-expressos no câncer do pâncreas e se correlacionam com a agressividade do tumor e sobrevida dos pacientes (YAMANAKA et al. 1993; RESNICK et al. 2004; WEY et al. 2005; ZHANG et al. 2007; BURRIS e ROCHA-LIMA 2008).

*Vascular endothelial growth factor* ou *fator de crescimento endotelial* (VEGF) é uma proteína sintetizada pelas células tumorais, que promove a neoangiogênese, em tumores sólidos. Há vários tipos de VEGF, como o VEGF A, VEGF B, VEGF C e VEGF D. O VEGF A é a variante que tem sido mais intensamente estudada, uma vez que além de atuar na neoangiogênese, aumenta a permeabilidade vascular. A angiogênese é essencial para o crescimento dos tumores com mais de 1mm<sup>3</sup> e deve ocorrer para que haja formação de metástases e crescimento tumoral. A super-expressão de VEGF tem sido demonstrada nos tumores pancreáticos. Estudo recente demonstrou que pacientes com tumores de pâncreas que expressavam VEGF-II apresentavam tumores mais indiferenciados e agressivos (BÜCHLER et al. 2002). A observação desses mecanismos de invasão e metástase já motivou o aparecimento de novas opções terapêuticas

farmacológicas, (RIESS 2008) como o uso do anticorpo anti-VEGF 1, já utilizados de forma investigacional em protocolos clínicos. KINDLER et al. (2005) recentemente demonstraram resultados promissores com o uso dessa modalidade terapêutica em pacientes com CaPa avançado.

Outros autores ainda correlacionaram a expressão de VEGF com micro densidade vascular, que também permite avaliar o potencial de crescimento e invasão de um tumor. Em um elegante estudo de SEO et al. (2000) a VEGF esteve diretamente relacionada com a micro densidade vascular, em pacientes operados por adenocarcinoma. Chama atenção ainda, que o aumento da expressão de VEGF nessa população do estudo esteve relacionada com presença de metástases hepáticas ( $p=0,01$ ), o que determina a impossibilidade de cura nesses pacientes.

Em outras neoplasias, como câncer colorretal, o Bevacizumab (anticorpo específico para VEGF), está sendo usado com resultados encorajadores devido a melhora de sobrevida e pela taxa de resposta em câncer de cólon metastático, também aprovado para uso em associação com esquemas clássicos de quimioterapia para essa doença (FOLFIRI, FOLFOX).

Já no adenocarcinoma de pâncreas, a experiência inicial com essa medicação em estudos de tratamento paliativo em tumores avançados do pâncreas, como quimioterapia de segunda linha, ainda não demonstraram impacto clínico significativo, sendo os resultados ainda pobres em termo de ganho na sobrevida (HURWITZ et al. 2005; CABEBE et al. 2007).

## 1.2 PAPEL DA LINFO-ANGIOGÊNESE

Disseminação tumoral por meio do sistema linfático pode estar presente em vários tumores. As células tumorais podem invadir a corrente linfática e se disseminarem para os linfonodos regionais que entram na corrente sanguínea, originando metástases a distância. Embora no câncer de pâncreas isso possa ocorrer e estar associado ao prognóstico (CAMERON et al. 2006), deve-se levar em consideração no estadiamento, a letalidade dessa doença e o componente sistêmico de outras vias de disseminação, a fim de não permitir que o tratamento regional das metástases linfonodais gere melhores resultados de sobrevida. Vários autores estudaram o papel de cirurgia estendida, no que diz respeito a linfadenectomia, visando um maior controle da doença, porém os resultados não mostraram ganho de sobrevida com essa modalidade de tratamento (PEDRAZOLLI et al. 1998; NIMURA et al. 2004; FARNELL et al. 2005). Como nos tecidos normais, tanto vasos sanguíneos como vasos linfáticos estão presentes no tecido tumoral, mas algumas diferenças têm sido observadas. Os vasos linfáticos na região central do tumor encontram-se diminuídos de tamanho enquanto que periféricamente encontram-se em maior número, com diâmetro maior e mais bem vascularizados (PADERA et al. 2002; TARBÉ et al. 2002). Alguns estudos demonstram maior conteúdo de VEGFR-C (OU VEGFR 3) nos vasos peri-tumorais, produzindo maior estímulo ao crescimento de novos vasos, inclusive vasos linfáticos. A maior

expressão deste receptor está associada ao maior acometimento linfonodal nestes pacientes (YANG et al. 2001).

A análise imunoistoquímica, poderia de uma forma bastante objetiva e confiável, aumentar a acurácia do estadiamento histopatológico, já que muitas vezes, particularmente em tumores muito indiferenciados, a análise pode ser de difícil avaliação. Além disso, a detecção de fatores de mau prognóstico em pacientes com tumores precoces, pode selecionar um grupo de pacientes que poderiam ser beneficiados com alguma modalidade de tratamento complementar com a radio e quimioterapia sistêmica.

O marcador D2-40 tem sido estudado, associado a avaliação de densidade vascular linfática, como uma ferramenta na determinação do prognóstico, bem como melhorar a acurácia da determinação de invasão linfática e metástase linfonodal.

Vários estudos avaliaram esse marcador em câncer de estômago e melanoma, por exemplo, porém a avaliação desse marcador no adenocarcinoma de pâncreas, não tem sido visto na literatura.

Em um estudo recente, um autor demonstrou que associando o uso de D2-40 por meio de imunoistoquímica, aumentou a detecção de invasão linfática, quando comparada com a análise convencional com Hematoxilina e Eosina (NIAKOSARI et al. 2005).

### 1.3 PAPEL DA CICLO-OXIGENASE 2

Recentemente, a observação de que a Ciclo-oxigenase-2 (COX 2), uma enzima produzida em processos inflamatórios diversos, está associada a pior prognóstico em pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas (sendo um fator independente na análise multivariada) tem despertado interesse em seu estudo (JUUTI et al. 2006; HERMANOVA et al. 2008; XU et al. 2008). Entre suas propriedades, estariam: uma ação pró-angiogênica e sua interação com marcadores de proliferação vascular e linfática. Sua expressão também tem sido correlacionada com a severidade das neoplasias intra-epiteliais, abrindo possibilidade de ligação entre a pancreatite crônica e o câncer do pâncreas. Isto poderia aventar a possibilidade de quimio-prevenção em um grupo de pacientes sobre risco (ALBAZAZ et al. 2005). Recentemente um grupo de autores demonstrou que a inibição de COX-2 com Celecoxib (fármaco antiinflamatório seletivo para COX-2) diminuiu a produção de prostoglandinas em uma população de camundongos, porém isso não se traduziu em diminuição da atividade tumoral, quando comparada ao grupo controle (JIMENO et al. 2006).

Entretanto, em outras neoplasias como câncer colorretal, o uso de AINES, demonstra resultados interessantes em pacientes portadores de algumas formas de pólipos adenomatosos, no que diz respeito a progressão de adenoma para adenocarcinoma.

## **2 OBJETIVOS**

- 1 Criar um banco de dados comum de tumores em parafina, de pacientes portadores de adenocarcinoma ductal de Pâncreas submetidos à ressecção com intuito curativo, entre o Hospital das Clínicas da FMUSP e o Hospital do Câncer A.C. Camargo-Fundação Antonio Prudente;
- 2 Avaliar a expressão de marcadores de imunoistoquímica relacionados com linfoangiogênese (D2- 40), angiogênese (VEGF-1) e inflamação (COX-2) no tecido tumoral, não tumoral e em linfonodos acometidos pelo câncer;
- 3 Correlacionar a expressão desses marcadores com os dados anátomo-patológicos, estadiamento da doença e sobrevida dos pacientes.

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

O tamanho estimado da amostra era de 80 pacientes do HCFMUSP e 20 pacientes do A.C. Camargo, entretanto após a seleção inicial dos casos reunimos um grupo com 86 pacientes dos quais foram excluídos 10 pacientes, tendo como causa da exclusão: óbito pós-operatório, material insuficiente para análise e revisão histopatológica revelando ausência de Adenocarcinoma Ductal. Trata-se de um trabalho tipo Coorte Retrospectivo, onde foram selecionados 76 pacientes portadores de adenocarcinoma ductal pancreático submetidos à ressecção cirúrgica com intuito curativo no Hospital A.C. Camargo (1998 e 2006) e Hospital de Clínicas da FMUSP (1990 a 2005).

#### **3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- 1 Diagnóstico de adenocarcinoma ductal do pâncreas;
- 2 Pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico, com intuito curativo, ou seja, ressecção completa da neoplasia na ausência de sinais de metástase no momento da cirurgia;
- 3 Ausência de doença metastática detectável no momento da cirurgia (ex. metástase peritoneal ou hepática, independente do tamanho ou número de lesões);

- 4      Blocos de parafina e lâminas disponíveis para revisão e confecção de novas lâminas para estudo.

### **3.2    CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

1.      Óbito pós- operatório (durante a internação que motivou a cirurgia);
2.      Pacientes onde o material anátomo-patológico impossibilitasse a análise imunoistoquímica.

### **3.3    ANÁLISE DE DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS**

Dados clínicos, laboratoriais e pré-operatórios considerados de relevância foram analisados, retrospectivamente, por meio de consulta ao prontuário médico e entrevista com os pacientes. Os prontuários médicos dos casos analisados foram revisados e obtidos dados demográficos como: idade, sexo e raça. Os dados clínicos de interesse foram: icterícia, emagrecimento e dor ao diagnóstico.

### **3.4    ANÁLISE DE DADOS DE PATOLOGIA CLÍNICA**

Os dados de Patologia clínica estudados foram: Nível de CA 19.9, glicemia e nível de bilirrubinas pré - operatório. O CA 19.9 foi medido em UI/dl, enquanto que a glicemia e o nível de bilirrubinas em mg/dl.

### 3.5 CONSENTIMENTO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA

Esse projeto foi submetido à apreciação das Comissões de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e do Hospital AC Camargo, tendo sido aprovado nas duas Instituições.

### 3.6 ESTADIAMENTO ANATOMO PATOLÓGICO

O estadiamento anátomo-patológico foi realizado de acordo com o manual da AJCC (UICC), conforme o Quadro abaixo.

**Quadro 1** - Estadiamento patológico TNM.

| <i>Tumor Primário</i>            |                                                              |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>T0</i>                        | Ausência de tumor primário                                   |
| <i>Tx</i>                        | Tumor primário não pode se avaliado                          |
| <i>Tis</i>                       | Tumor in situ                                                |
| <i>T1</i>                        | Tumor de 2 cm ou menos                                       |
| <i>T2</i>                        | Tumor de mais de 2 cm, confinado ao pâncreas                 |
| <i>T3</i>                        | Tumor se estende além do pâncreas, porém poupa o TC e/ou AMS |
| <i>T4</i>                        | Tumor se estende além do pâncreas e invade o TC e/ou AMS     |
| <i>Linfonodos Regionais (N)</i>  |                                                              |
| <i>Nx</i>                        | Linfonodo regional não avaliável                             |
| <i>N0</i>                        | Ausência de linfonodo regional acometido                     |
| <i>N1</i>                        | Linfonodo Regional acometido pela neoplasia                  |
| <i>Metástase a distância (M)</i> |                                                              |
| <i>Mx</i>                        | Metástase a distância não avaliável                          |
| <i>M0</i>                        | Ausência de metástase a distância                            |
| <i>M1</i>                        | Presença de metástase a distância                            |

**Quadro 2** - Estadiamento clínico para adenocarcinoma do pâncreas segundo a AJCC (UICC).

| <i><b>Estádio</b></i> | <i><b>Tumor</b></i> | <i><b>Linfonodo</b></i> | <i><b>Metastase</b></i> |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i><b>0</b></i>       | Tis                 | N0                      | M0                      |
| <i><b>IA</b></i>      | T1                  | N0                      | M0                      |
| <i><b>IB</b></i>      | T2                  | N0                      | M0                      |
| <i><b>IIA</b></i>     | T3                  | N0                      | M0                      |
| <i><b>IIB</b></i>     | T1-3                | N1                      | M0                      |
| <i><b>III</b></i>     | T4                  | Qualquer N              | M0                      |
| <i><b>IV</b></i>      | Qualquer T          | Qualquer N              | M1                      |

### **3.7 CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E AVALIAÇÃO DE GRAU DE DIFERENCIAÇÃO**

Foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo e do Hospital de Clinicas todas as lâminas e blocos de parafina, referentes aos pacientes previamente selecionados.

Os primeiros cortes representativos obtidos foram então corados pela técnica tradicional de HE. A revisão de lâmina permitiu a confirmação do diagnóstico e a análise histológica. Todas as lâminas foram analisadas e revisadas por um mesmo patologista, visando uniformidade de diagnóstico. A partir da lâmina de HE foi determinada presença ou não de invasão vascular, perineural e linfática, bem como diâmetro máximo da lesão, status das margens e grau de diferenciação. O tamanho do tumor foi medido em cm e até uma casa decimal, a partir do laudo inicial da Anatomia Patológica do caso estudado, bem como o número de linfonodos dissecados e acometidos pela patologia de base.

As margens avaliadas foram: margem pancreática, margem da via biliar, duodeno e/ou estômago (em tumores de cabeça de pâncreas) e margem do pâncreas para tumores de corpo e cauda. Foi considerada margem “livre”, a ausência de acometimento microscópica de todas as margens estudadas. Denominamos margem comprometida ou positiva quando qualquer uma das margens estivesse comprometida, tanto macroscopicamente, quanto microscopicamente.

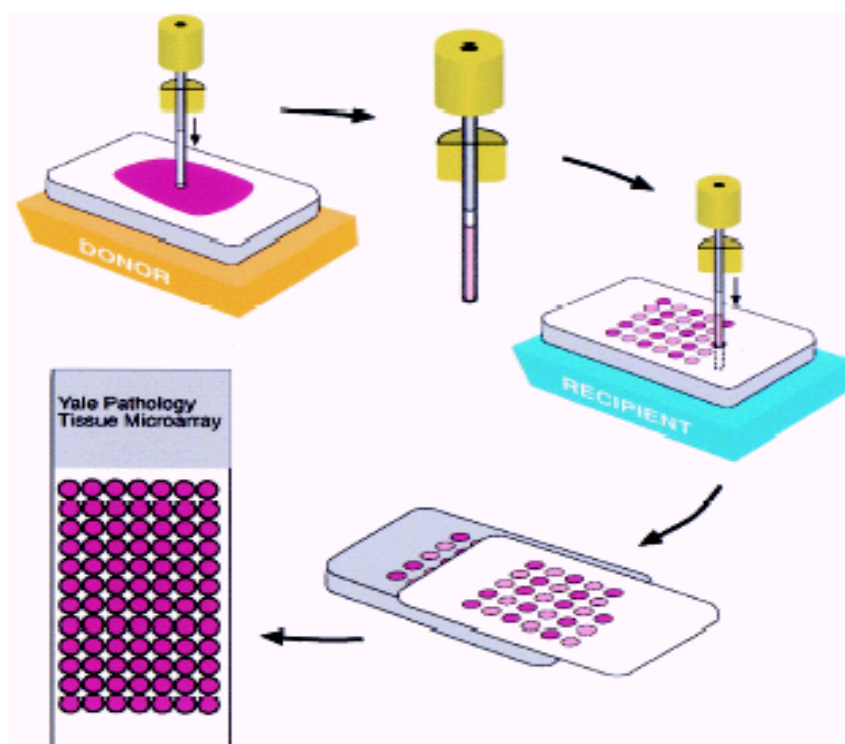
O grau de diferenciação foi determinado em todos os pacientes, conforme critérios previamente descritos pela Organização Mundial de Saúde-OMS. O quadro abaixo, sintetiza os critérios de classificação (KLOPPEL 2000).

**Quadro 3** - Critérios de classificação de grau de diferenciação.

| <b><i>Grau tumoral</i></b> | <b><i>Diferenciação glandular</i></b> | <b><i>Produção de mucina</i></b> | <b><i>Número de mitoses por campo</i></b> | <b><i>Características Nucleares</i></b>    |
|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b><i>Grau I</i></b>       | Bem diferenciado                      | Intensa                          | < 5                                       | Pouco polimorfismo, arranjo polar          |
| <b><i>Grau II</i></b>      | Moderadamente Diferenciado            | Irregular                        | 6 a 10                                    | Polimorfismo moderado                      |
| <b><i>Grau III</i></b>     | Pouco Diferenciado                    | Ausente                          | >10                                       | Polimorfismo acentuado e tamanho aumentado |

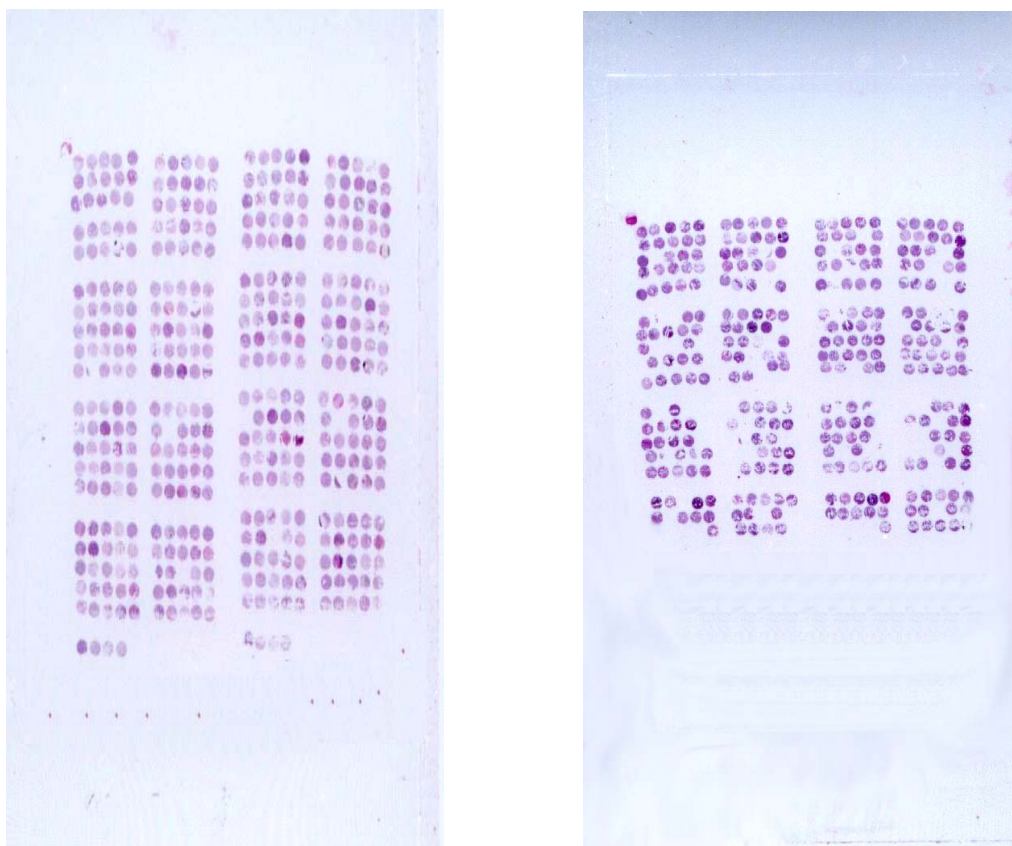
### 3.8 CONSTRUÇÃO DO “TISSUE MICROARRAY” (TMA)

A partir de blocos representativos das lesões selecionadas, novas lâminas de HE foram confeccionadas para a identificação da área a ser utilizada no TMA, por meio de marcação circular da região mais representativa do tecido de interesse. Usando o *tissue microarray* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), a área de interesse foi previamente marcada na lâmina e identificada no bloco doador. Foi retirada em duplicata (corte de 1mm) e transferida para um bloco receptor.



Fonte: KONONEN et al. (1998).

**Figura 1** - Representação esquemática da punção e transferência das áreas selecionadas do bloco doador para o bloco receptor – tissue microarray.



**Figura 2** - Aspecto das lâminas receptoras (cada “core” corresponde a um caso ou tecido a ser estudado).

### **3.9 IMUNOISTOQUÍMICA**

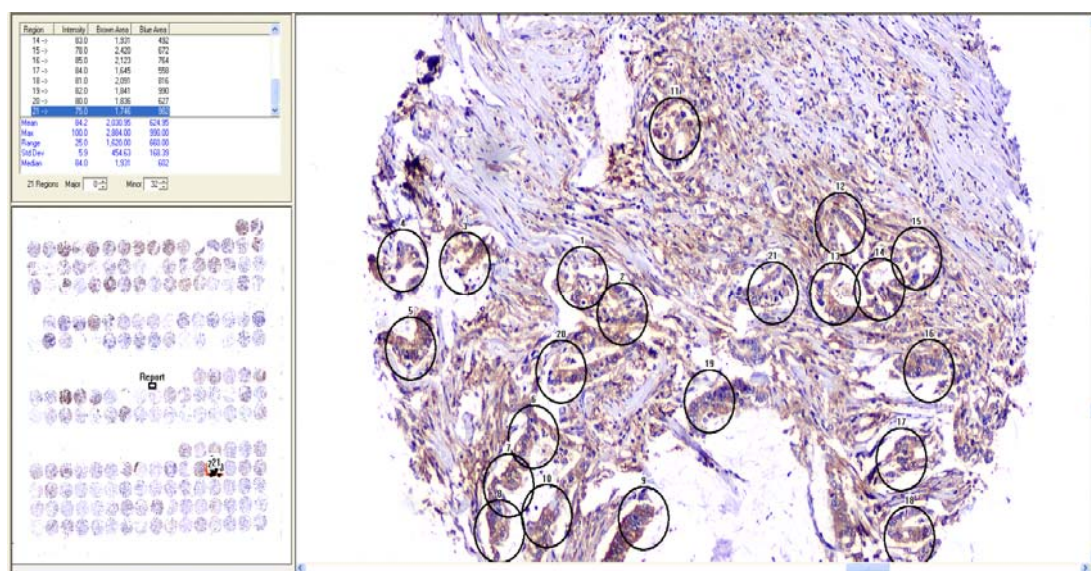
As reações imunoistoquímicas foram realizadas nos cortes histológicos dos blocos de TMA. Resumidamente, as lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS – Sigma® A3648) diluída a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 3µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor por panela de pressão, utilizando-se tampão citrato pH

6,0 para COX-2 e banho-maria. Foi utilizado como tampão solução EDTA/TRIS pH 9,0. Uma vez preparados os cortes, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, seguida da incubação com o anticorpo primário específico. As diluições finais para os anticorpos utilizados foram de: 1/3000 para COX-2; 1/200 para VEGF-1 e 1/400 para D2-40. As reações foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Dako®) a 60mg% e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck®). As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e controle negativos, onde não foi utilizado o anticorpo primário. Os anticorpos utilizados foram NovoCasta® para COX-2, Neomarkers® para VEGF-1, e Dako® D2-40.

### **3.10 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS**

A análise da expressão imunoistoquímica das proteínas COX-2, VEGF-1 e D2-40 foi realizada quantitativamente por meio da leitura automatizada pelo ACIS III (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). As lâminas foram “escaneadas” no modo membrana para o modo VEGF e citoplasma para COX-2, e analisadas por meio de imagem magnificada, campo por campo, que permite discriminação do detalhe histológico. Os detalhes da técnica de escaneamento e quantificação da intensidade podem ser avaliados no site do fabricante (<http://www.chromavision.com>). A análise das reações foi realizada por meio do número absoluto obtido pela média de densidade

óptica do core estudado, Uma única patologista avaliou e marcou os casos, que foi dividido pelo número de background (considerado como densidade negativa), e realizado uma média entre as duas amostras de cada caso.



**Figura 3** - Aspecto do *lay out* da software utilizado, em detalhe a marcação das áreas de interesse (focos de neoplasia).

### 3.11 ANALISE ESTATÍSTICA

A casuística foi caracterizada por meio da estatística descritiva, empregando-se o calculo de média, desvio padrão e frequência absoluta e relativa das variáveis. Para a análise de associação entre as variáveis quantitativas empregou-se o teste de qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher, dependendo-se dos valores esperados das tabelas de contingência.

A análise de sobrevida global foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, sendo as curvas comparadas pelo teste de long-rank. Para tanto,

calculou-se o intervalo de acompanhamento com base nas datas da cirurgia e da última informação objetiva em prontuário. Em todos os testes estatísticos adotou-se o nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DEMOGRÁFICOS

Foram estudados 76 pacientes, sendo a maioria do sexo feminino 52, 2 % e 47,8% homens. A idade dos pacientes variou entre 28 e 87 anos de idade com uma idade média de 59 anos e mediana de 60 anos.

A Tabela abaixo representa as características demográficas dos pacientes estudados.

**Tabela 2** - Resultados das categorias demográficas na população estudada.

| <i>Variável</i>     | <i>Categoria</i>  | <i>freq (%)</i> |
|---------------------|-------------------|-----------------|
| <b>Sexo</b>         | <b>Masculino</b>  | <b>36(47,8)</b> |
|                     | <b>feminino</b>   | <b>40(52,2)</b> |
| <b>Raça</b>         | <b>Branco</b>     | <b>53(74)</b>   |
|                     | <b>Negro</b>      | <b>16(19)</b>   |
|                     | <b>Oriental</b>   | <b>7(7)</b>     |
| <b>Idade (anos)</b> | <b>Min – max</b>  | <b>28 – 87</b>  |
|                     | <b>Mediana</b>    | <b>60</b>       |
|                     | <b>Média (dp)</b> | <b>59</b>       |
|                     |                   |                 |

## 4.2 RESULTADOS CLÍNICOS: SINTOMAS E PATOLOGIA CLÍNICA

As principais características clínicas, sintomas e exames subsidiários, estão demonstradas com os dados obtidos a partir da população estudada. Icterícia e dor ao diagnóstico não estavam avaliáveis de forma confiável na maioria dos pacientes, dessa forma não são demonstradas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Descrição de variáveis clínicas e laboratoriais.

| <i>Variável</i>      | <i>Categoria</i> | <i>N (%) / mg/dl</i> |
|----------------------|------------------|----------------------|
| <b>CA 19.9</b>       | <b>Média</b>     | <b>13.297</b>        |
|                      | <b>Mediana</b>   | <b>187</b>           |
|                      | <b>Min- Max</b>  | <b>0,5- 500.000</b>  |
| <b>Bilirrubinas</b>  | <b>Média</b>     | <b>12</b>            |
|                      | <b>Mediana</b>   | <b>9,9</b>           |
|                      | <b>Min- Max</b>  | <b>0,5- 39</b>       |
| <b>Emagrecimento</b> | <b>Sim</b>       | <b>56(73,8)</b>      |
|                      | <b>Não</b>       | <b>20(26,2)</b>      |
| <b>Glicemia</b>      | <b>&gt;126</b>   | <b>32(43)</b>        |
|                      | <b>&lt;126</b>   | <b>44(57)</b>        |

## 4.3 ESTADIAMENTO

A grande maioria dos pacientes apresentava estadiamento histopatológico de estádios IIA ou IIB, entretanto todos os estádios estavam representados, sendo infrequente os tumores precoces. A Tabela abaixo demonstra a distribuição dos pacientes quanto ao estadiamento histopatológico.

**Tabela 4** - Distribuição dos pacientes estudados por estágio.

| <i><b>Categoria</b></i> | <i><b>Frequência</b></i> | <i><b>%</b></i> |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| <i><b>IA</b></i>        | 5                        | 6,1             |
| <i><b>IB</b></i>        | 10                       | 13,6            |
| <i><b>IIA</b></i>       | 15                       | 19,7            |
| <i><b>IIB</b></i>       | 40                       | 57,6            |
| <i><b>III</b></i>       | 2                        | 3,0             |
| <i><b>Total</b></i>     | 76                       | 100,0           |

#### **4.4 RESULTADOS DESCRITIVOS DE HISTOPATOLOGIA NA POPULAÇÃO ESTUDADA**

Os resultados de anatomia patológica foram: grau de diferenciação, topografia da lesão, número de linfonodos ressecados, número de linfonodos positivos, tamanho do tumor, invasão perineural e invasão vascular. A tabela abaixo demonstra como se apresenta o grupo estudado, em relação as variáveis morfológicas estudadas.

**Tabela 5** - Descrição dos resultados histopatológicos na população estudada.

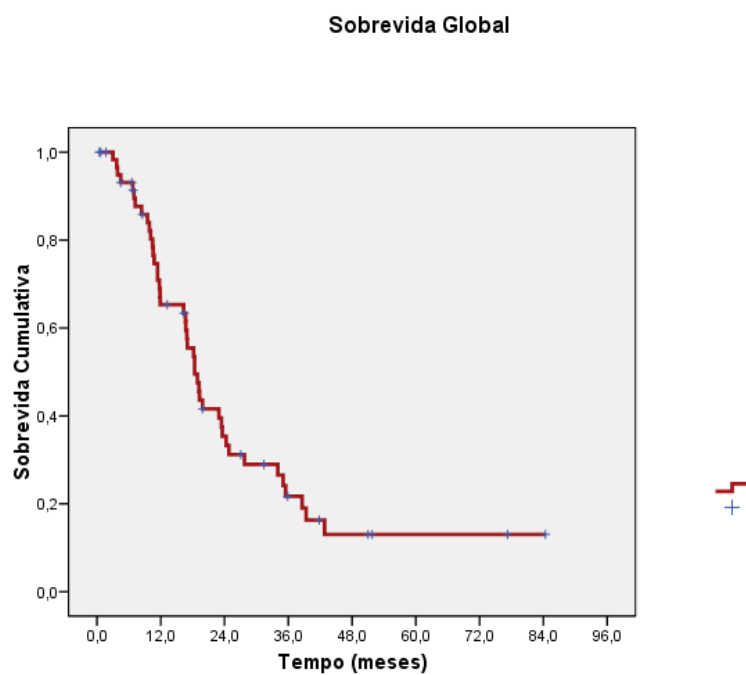
| <i>Variável</i>                     | <i>Categoria</i>           | <i>N(%)</i>    |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------|
| <b><i>Grau de Diferenciação</i></b> | Bem Diferenciado           | 21(28,4)       |
|                                     | Moderadamente Diferenciado | 51(67,2)       |
|                                     | Indiferenciado             | 4(4,4)         |
| <b><i>Topografia</i></b>            | Cabeça                     | 70(92,5)       |
|                                     | Corpo e Cauda              | 06(7,5)        |
| <b><i>Linfonodos</i></b>            | Média                      | 11             |
| <b><i>Ressecados</i></b>            | Mediana                    | 10             |
|                                     | Min- Max                   | 01- 53         |
| <b><i>Linfonodos Positivos</i></b>  | Média                      | 02             |
|                                     | Mediana                    | 01             |
|                                     | Min- Max                   | 0- 11          |
| <b><i>Tamanho do Tumor</i></b>      | Média                      | 3,8(cm)        |
|                                     | Mediana                    | 3,2(cm)        |
|                                     | Min- Max                   | 1,5- 10,3 (cm) |
| <b><i>Invasão Perineural</i></b>    | Positivo                   | 63(83,3)       |
|                                     | Negativo                   | 13(16,7)       |
| <b><i>Invasão Vascular</i></b>      | Sim                        | 50(66)         |
|                                     | Não                        | 26(34)         |

#### 4.5 ANÁLISE DE RESULTADOS DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS SOBRE O PROGNÓSTICO- ANÁLISE UNIVARIADA

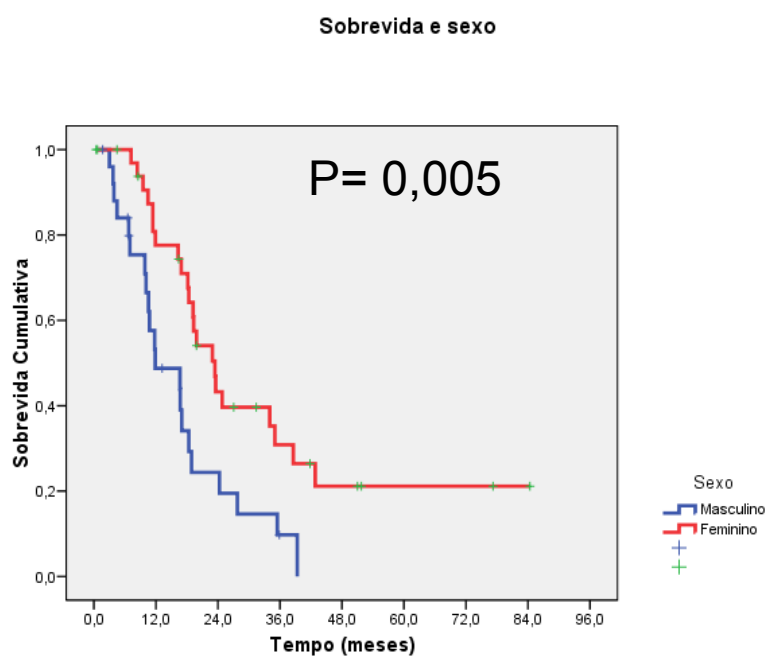
Na análise uni-variada, Sexo, Nível de Bilirrubina, Grau de Diferenciação e Invasão Perineural mostraram-se significativas em relação a sobrevida dessa população estudada. As Figuras abaixo demonstram a representação gráfica dessas variáveis sobre a sobrevida.

Idade, Tamanho do Tumor, Linfonodos acometidos, Glicemia, Ca19,9, Raça, Invasão vascular e Invasão Linfática não foram significativas no que diz respeito ao prognóstico dessa população.

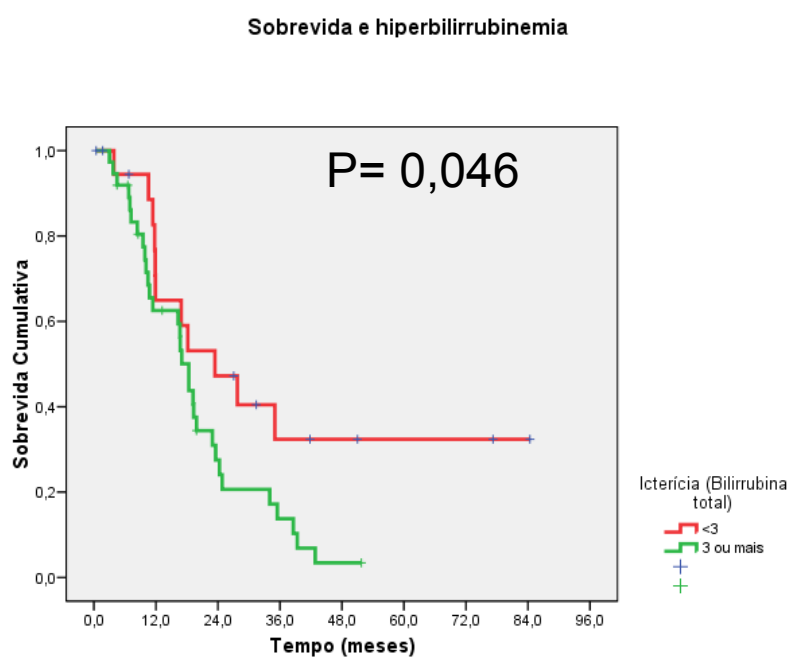
A sobrevida global estimada dessa população estudada em 24 meses é de 33% e em 36 meses de 20%. A sobrevida estimada em 5 anos é de 13%.



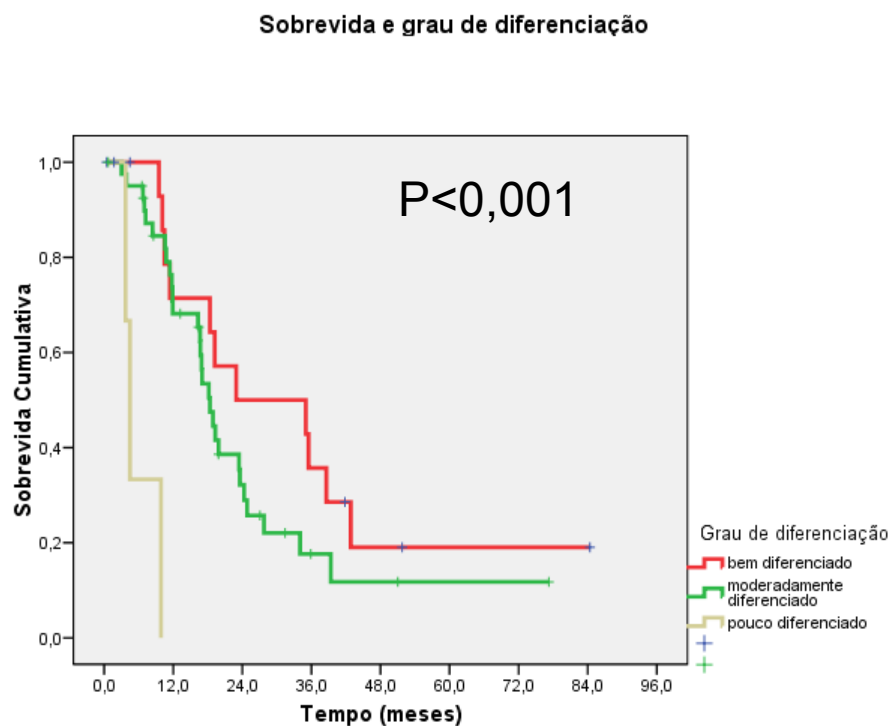
**Figura 4** - Gráfico de sobrevida global



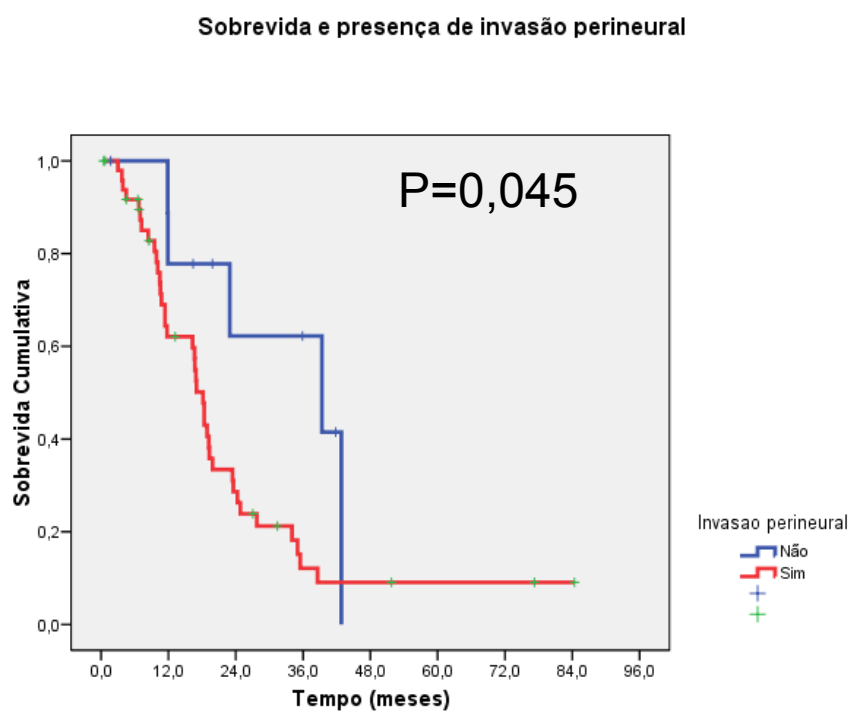
**Figura 5** - Gráfico da correlação de sexo e sobrevida.



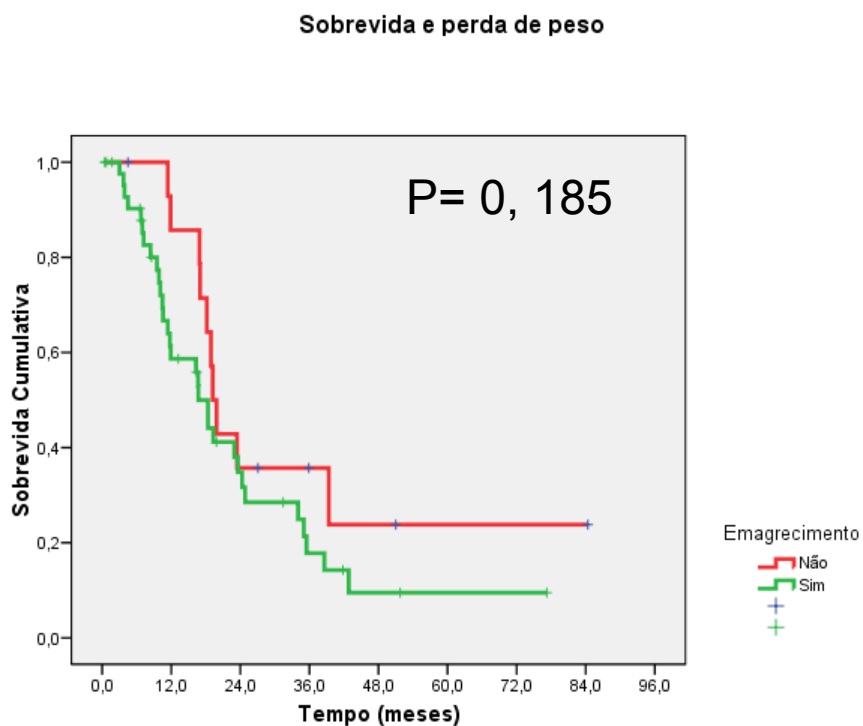
**Figura 6** - Gráfico da correlação entre nível de bilirrubina e sobrevida.



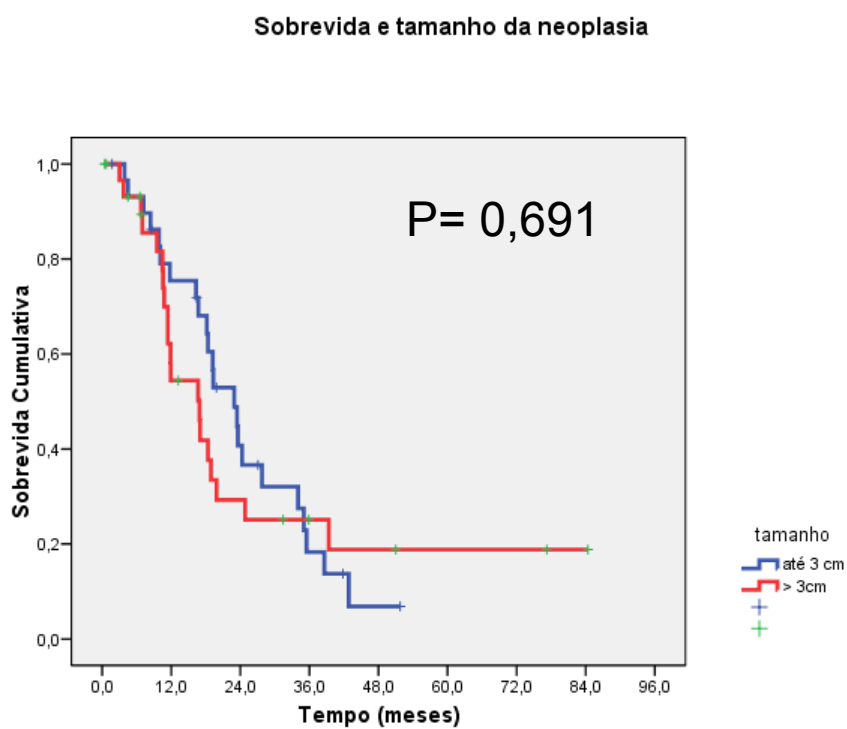
**Figura 7** – Gráfico da correlação entre grau de diferenciação e sobrevida.



**Figura 8** - Gráfico da correlação entre invasão perineural e sobrevida.

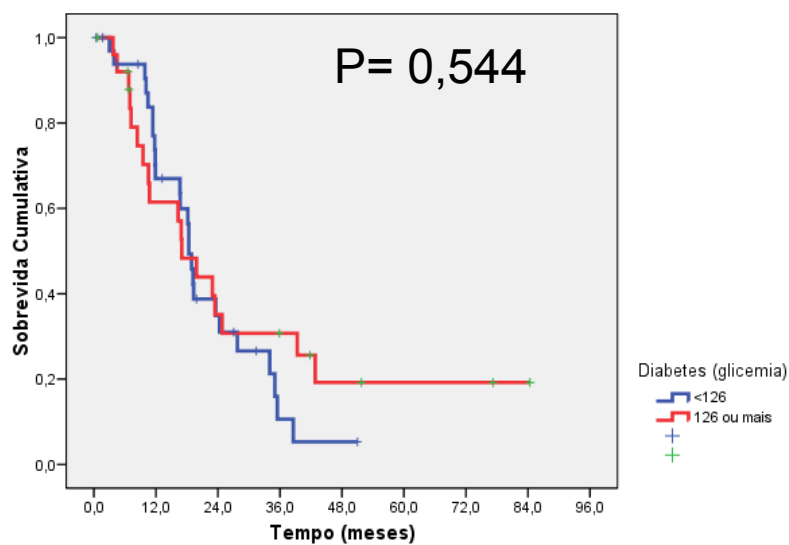


**Figura 9** - Gráfico da correlação entre perda de peso e sobrevida.



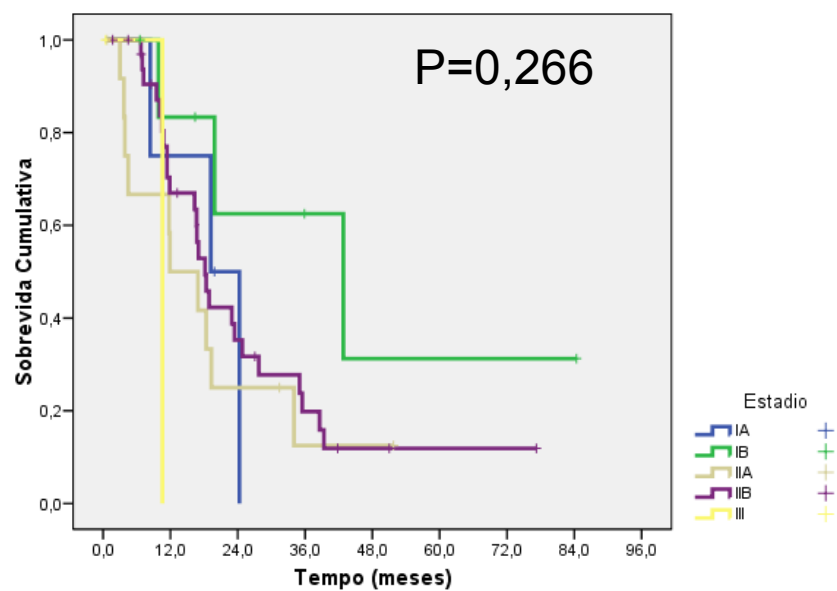
**Figura 10** - Gráfico da correlação entre o tamanho do tumor e sobrevida.

## Sobrevida e Diabetes mellitus



**Figura 11** - Gráfico da correlação entre glicemia e sobrevida.

## Sobrevida por estadiamento



**Figura 12** - Gráfico da correlação entre estadiamento e sobrevida.

#### 4.6 ANÁLISE DE RESULTADOS DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS SOBRE O PROGNÓSTICO- ANÁLISE MULTIVARIADA

Na análise multivariada, CA 19.9, Invasão perineural e grau de diferenciação foram fatores independentes associados à sobrevivência dos pacientes estudados. Enquanto que Sexo, COX- 2 e Icterícia apresentem tendência a demonstrar impacto na sobrevivência, não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

A Tabela abaixo demonstra os resultados obtidos na análise multivariada.

**Tabela 6 - Resultados análise multivariada.**

| <i>Variável</i>           |                       | <i>OR</i>    | <i>P</i>     | <i>IC</i>           |
|---------------------------|-----------------------|--------------|--------------|---------------------|
| <b>Sexo F</b>             |                       | <b>0,3</b>   | <b>0,1</b>   | <b>0,93- 1,2</b>    |
| <b>Ca 19.9</b>            |                       | <b>3,2</b>   | <b>0,04</b>  | <b>1,03- 10,2</b>   |
| <b>Icterícia</b>          |                       | <b>1,7</b>   | <b>0,4</b>   | <b>0,4- 5,9</b>     |
| <b>Diferenciação</b>      | <b>Bem</b>            | <b>2,65</b>  | <b>0,11</b>  | <b>0,77- 9,04</b>   |
|                           | <b>Moderado</b>       | <b>9,15</b>  | <b>0,102</b> | <b>0,64- 129,7</b>  |
|                           | <b>Indiferenciado</b> | <b>13,93</b> | <b>0,012</b> | <b>1,69- 114, 9</b> |
| <b>COX-2</b>              |                       | <b>0,9</b>   | <b>0,87</b>  | <b>0,27- 2,96</b>   |
| <b>Invasão Perineural</b> |                       | <b>13,93</b> | <b>0,014</b> | <b>1,69- 114,9</b>  |

OR= Odds Ratio; P= p valor; IC= Intervalo de confiança

#### 4.7 EXPRESSÃO DE COX-2 NO ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS, TECIDO NORMAL E METÁSTASE LINFONODAL

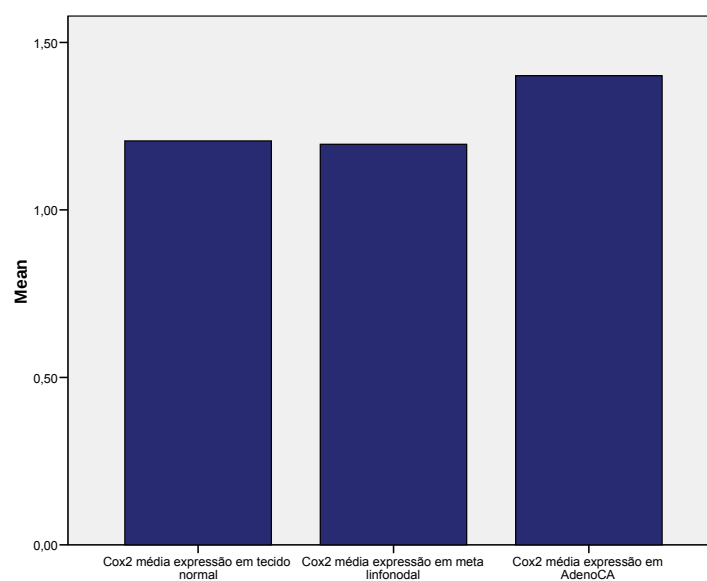
A quase totalidade dos pacientes estudados expressava o marcador COX- 2, variando de grau de intensidade. Após obter média de expressão de duas amostras, foi obtida escala decimal para análise dos resultados (tabela abaixo), conforme descrição prévia na sessão de métodos.

A expressão de COX-2 apresenta uma tendência a estar mais expressa no tecido tumoral, quando comparado ao tecido normal , e o tecido linfonodal acometido pela doença, entretanto isto não apresentou significância estatística.

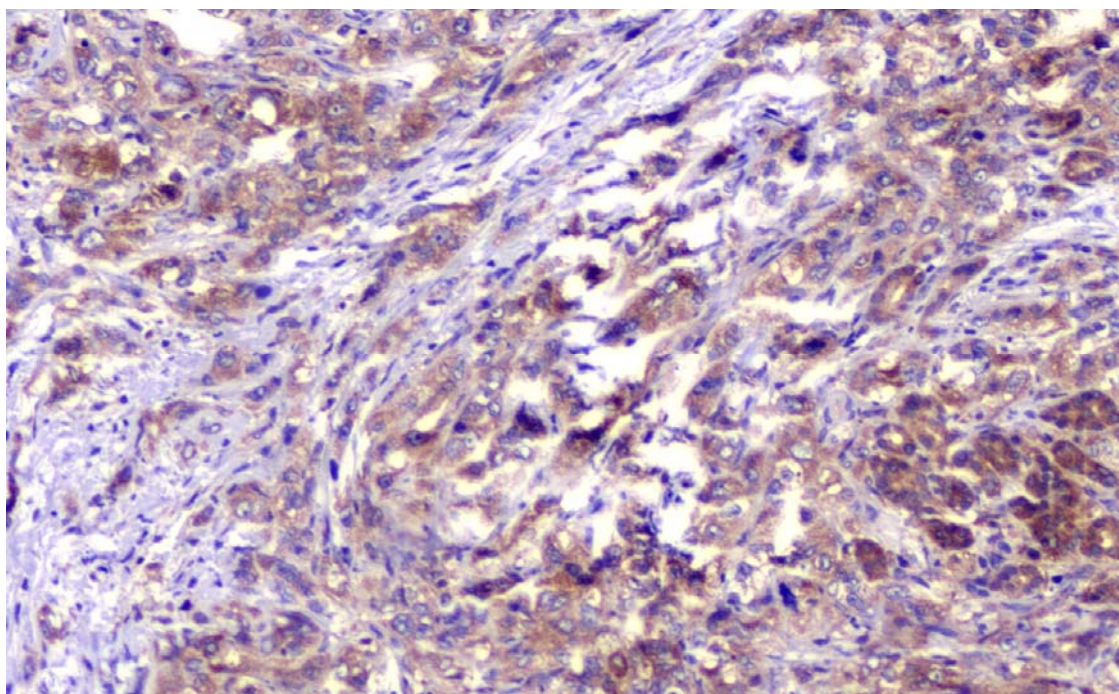
A expressão de COX-2 embora demonstre uma tendência a estar associada a um melhor prognóstico quando mais expressa, não foi estatisticamente significativa, conforme mostra na Figura abaixo.

**Tabela 7** - Variação da expressão do marcador COX- 2 nos diferentes tecidos. (P=NS).

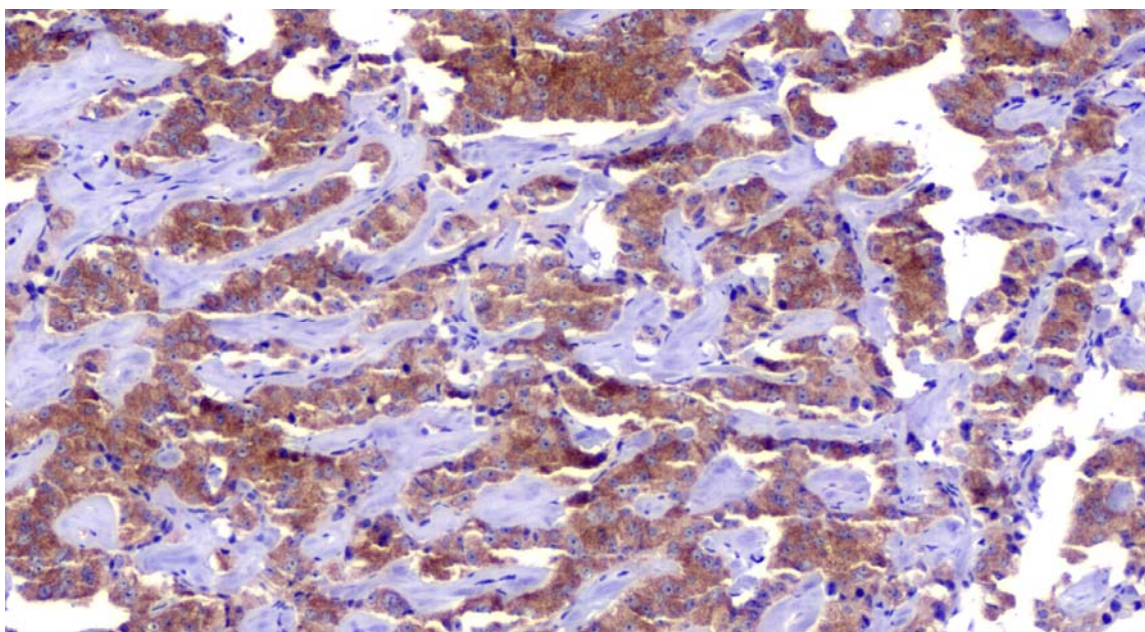
| COX- 2        | TUMOR | META LINFONODAL | TECIDO NORMAL |
|---------------|-------|-----------------|---------------|
| Mínimo        | 1,04  | 1,02            | 1,09          |
| Máximo        | 1,95  | 2,39            | 1,45          |
| Média         | 1,385 | 1,35            | 1,26          |
| Mediana       | 1,316 | 1,19            | 1,26          |
| Percentil 25% | 1,198 | 1,11            | 1,18          |
| Percentil 50% | 1,316 | 1,19            | 1,26          |



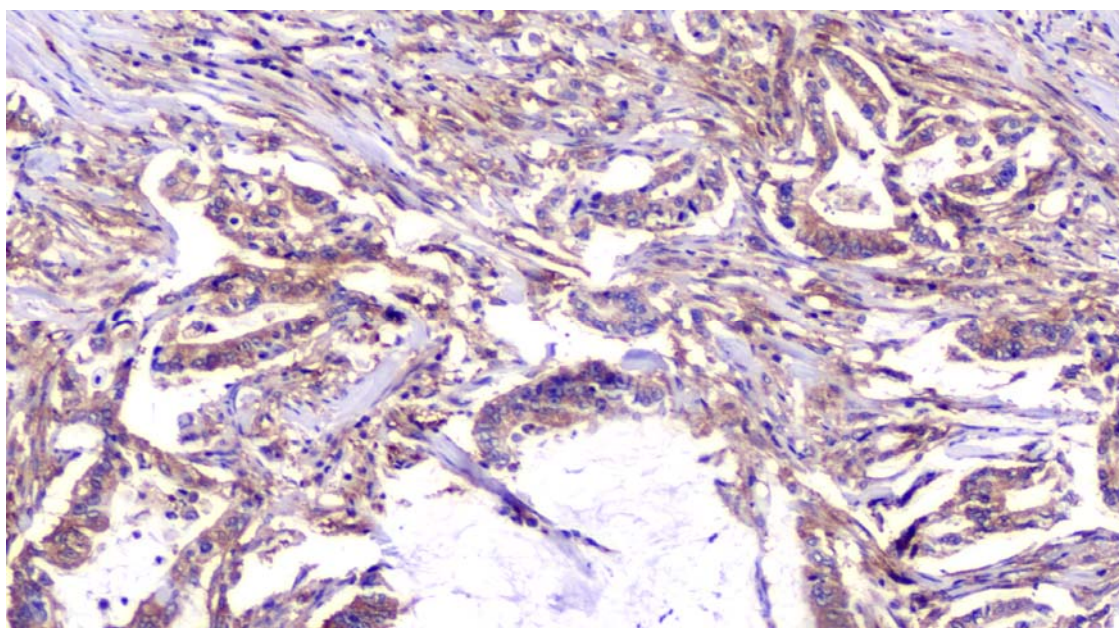
**Figura 13** - Gráfico da representação gráfica da distribuição das médias de expressão de COX- 2 nos diferentes tecidos. (p= NS).



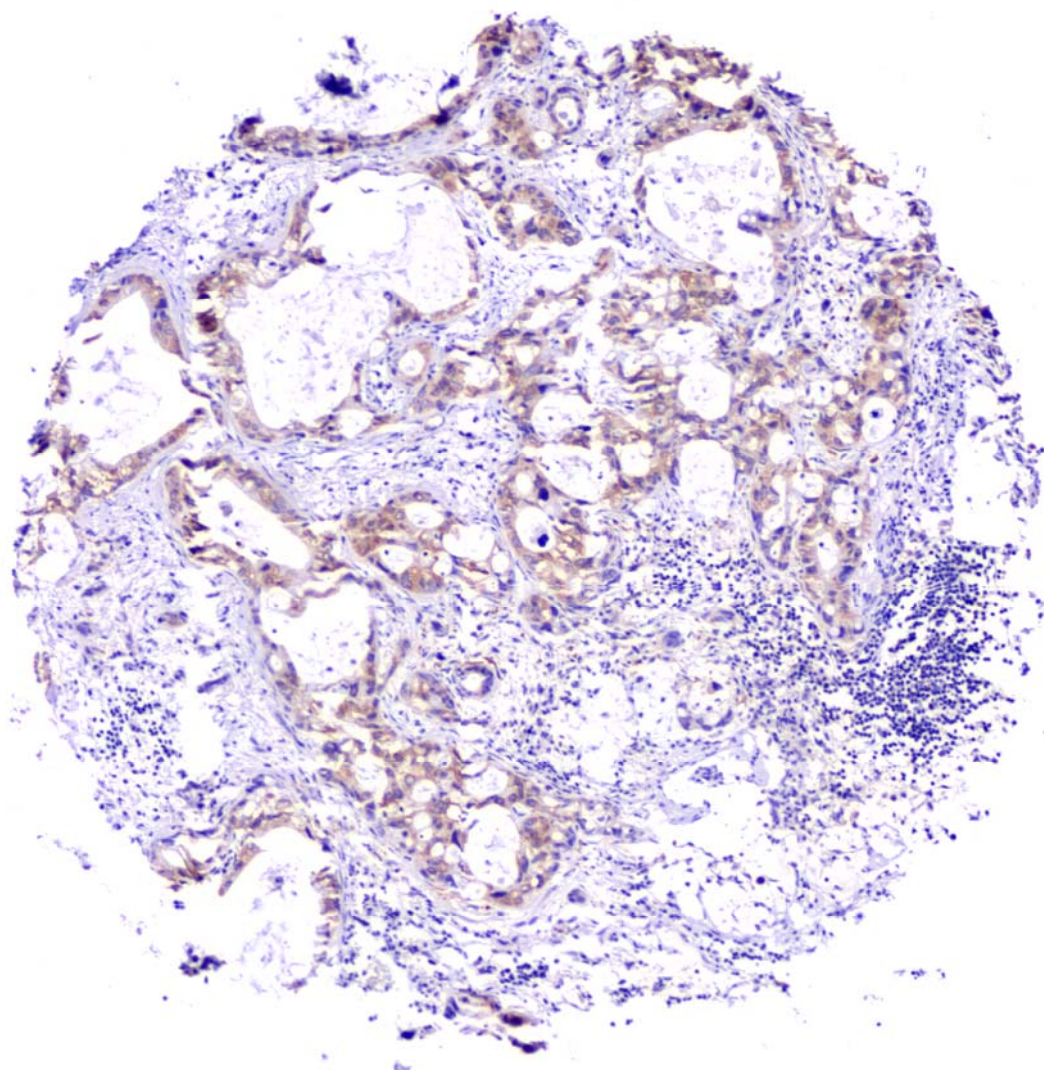
**Figura 14** - Expressão moderada de COX- 2 no tecido tumoral.



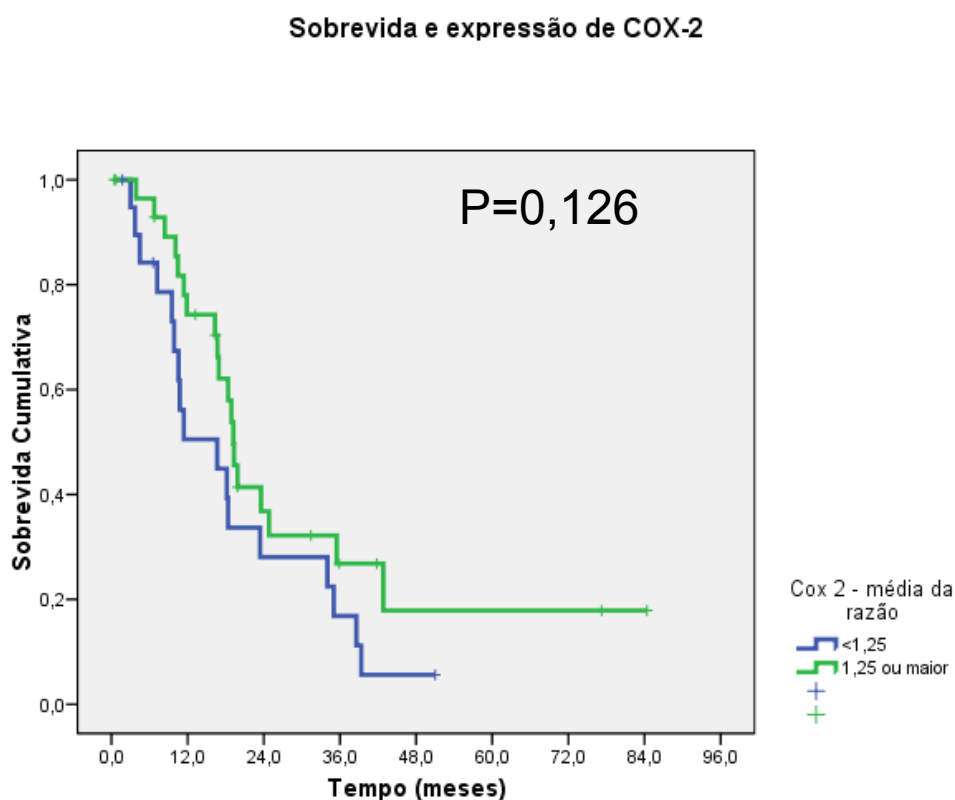
**Figura 15** - Expressão forte de COX- 2 em adenocarcinoma de pâncreas



**Figura 16** - Expressão fraca de COX- 2 em adenocarcinoma de pâncreas.



**Figura 17** - Expressão de COX-2 em metástase linfonodal.



**Figura 18** - Gráfico da sobrevida e expressão de COX- 2.

#### **4.8 EXPRESSÃO DE VGF1 NO ADECOCARCINOMA DE PÂNCREAS**

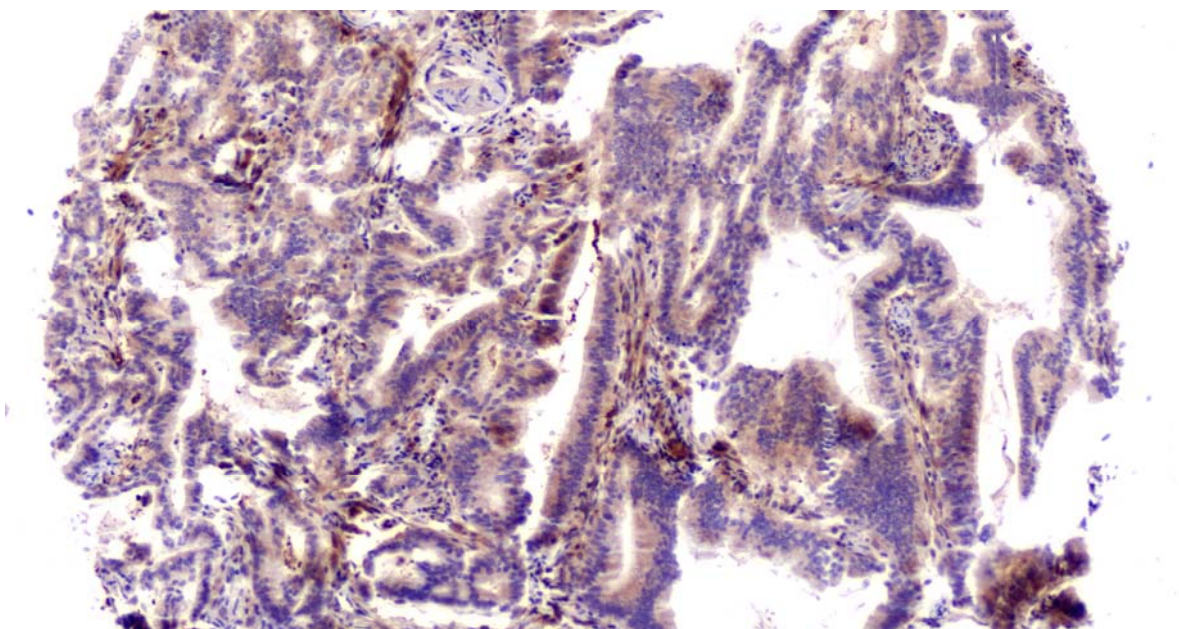
A quase totalidade dos pacientes estudados expressava o marcador VEGF-1, variando de grau de intensidade, entre os diferentes tipos de tecidos: tecido tumoral, tecido normal peritumoral e metástase linfonodal.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a expressão do marcador nos diferentes tecidos estudados.

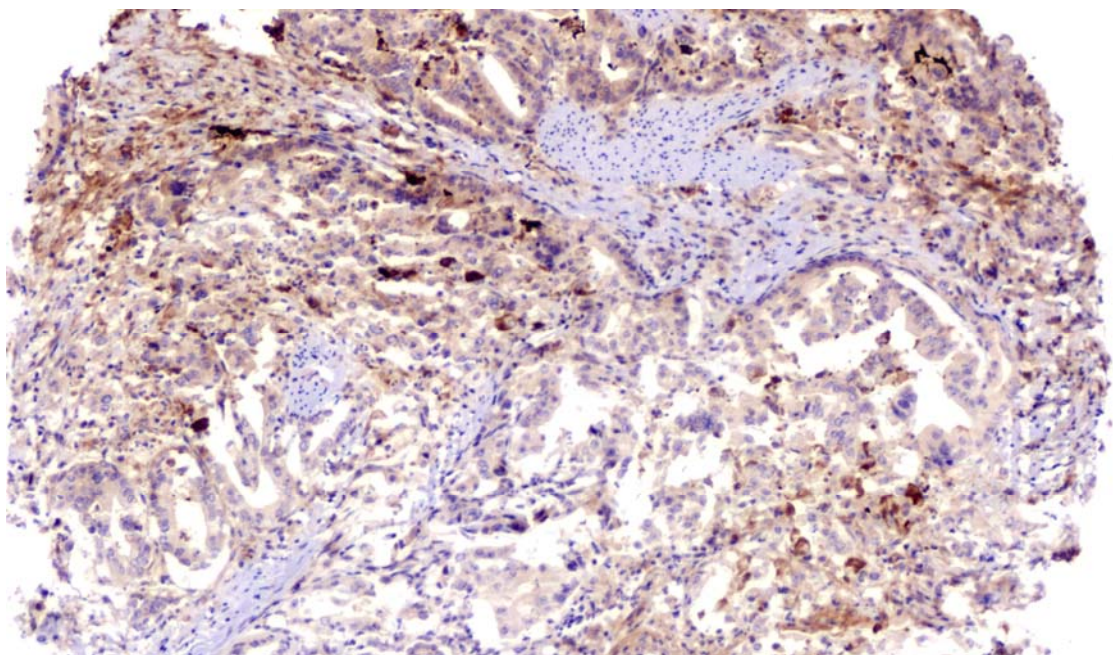
A expressão de VEGF-1 não esteve significativamente associada ao prognóstico nessa população estudada.

**Tabela 8** - Variação da expressão do marcador VEGF-1 nos diferentes tecidos. (P=NS).

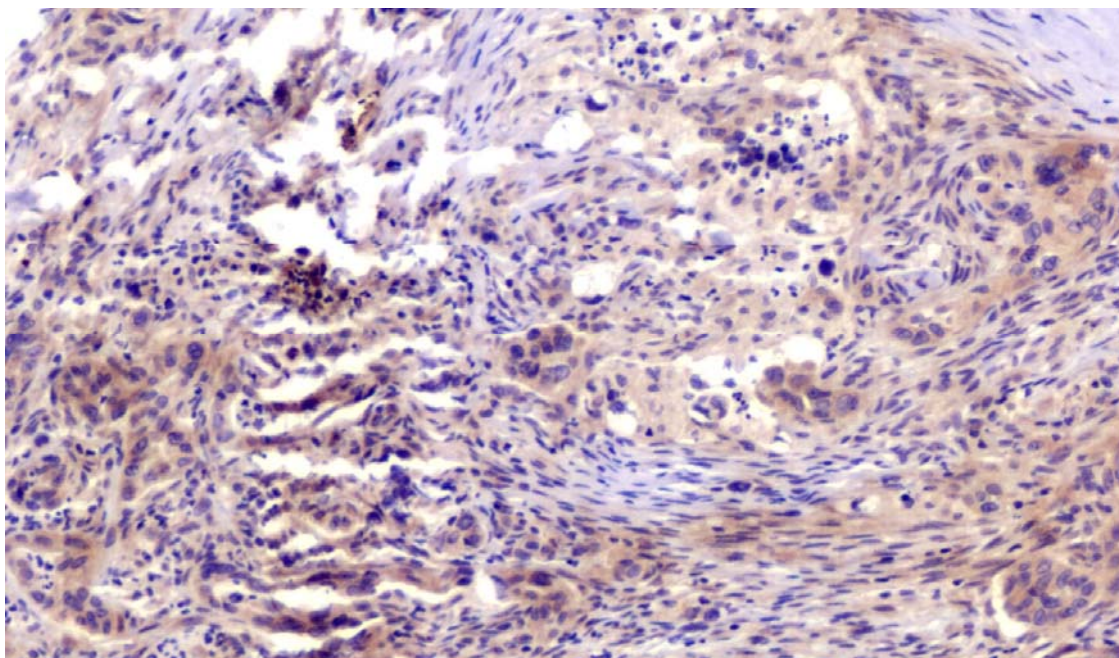
| VEGF=1        | TUMOR | META LINFONODAL | TECIDO NORMAL |
|---------------|-------|-----------------|---------------|
| Mínimo        | 0,53  | 1,23            | 1,14          |
| Máximo        | 1,95  | 1,75            | 1,80          |
| Média         | 1,35  | 1,41            | 1,44          |
| Mediana       | 1,32  | 1,39            | 1,43          |
| Percentil 25% | 1,20  | 1,26            | 1,28          |
| Percentil 50% | 1,32  | 1,39            | 1,43          |



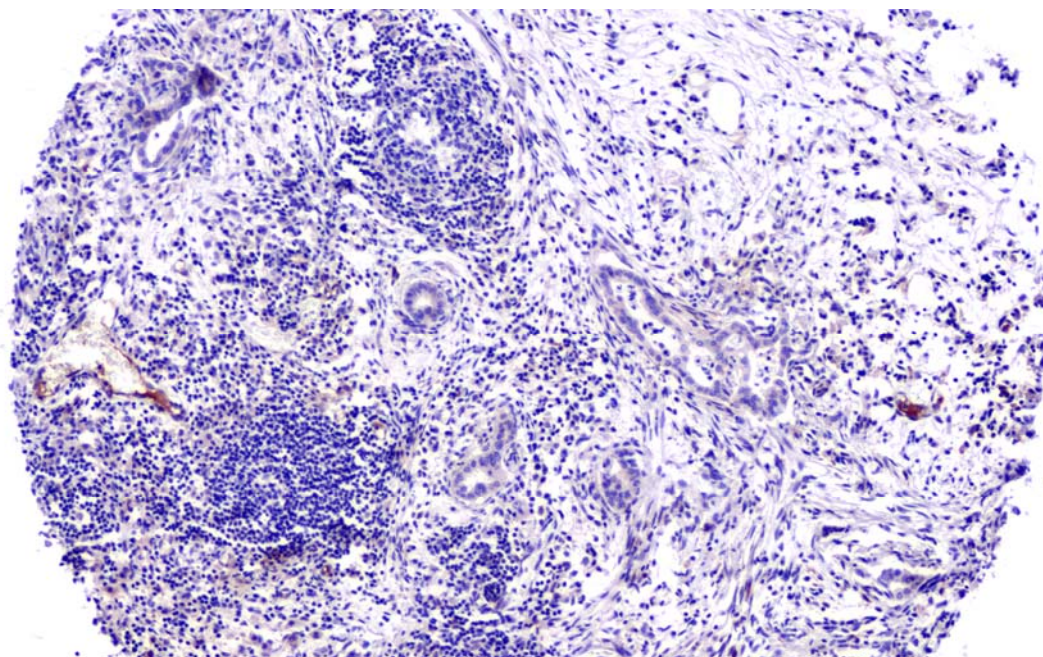
**Figura 19** - Expressão citoplasmática forte de VEGF em adenocarcinoma de pâncreas.



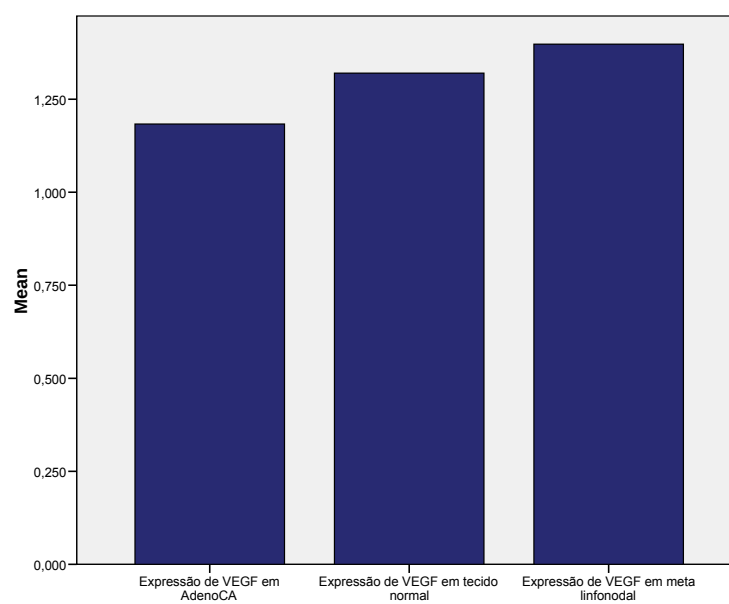
**Figura 20** - Expressão fraca citoplasmática de VEGF em Adenocarcinoma de pâncreas.



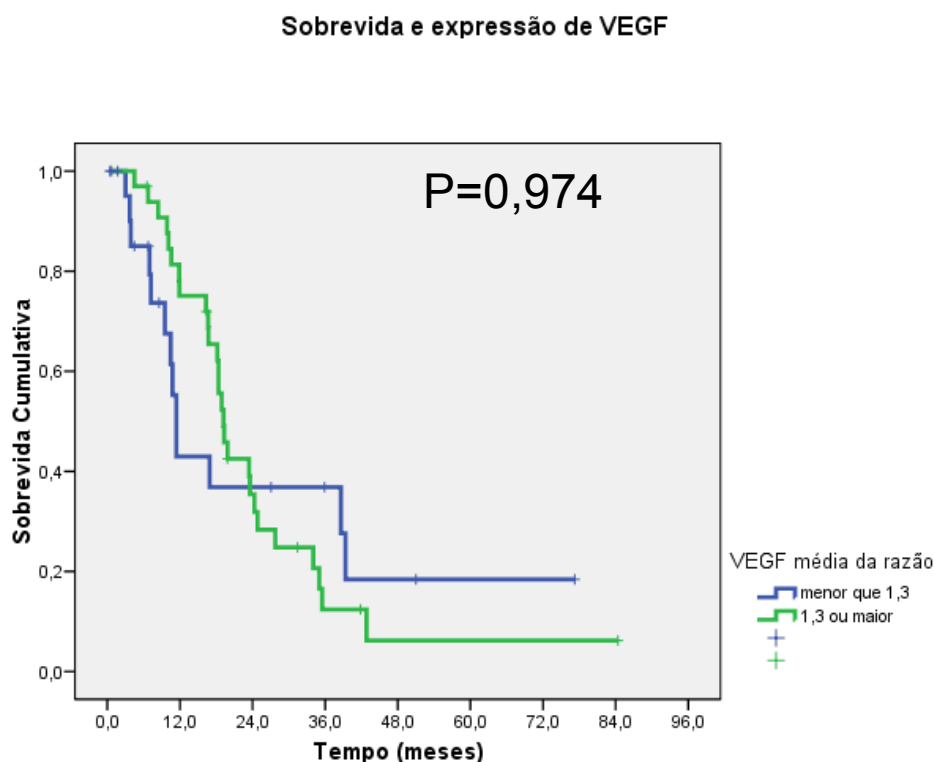
**Figura 21** - Expressão moderada de VEGF em adenocarcinoma de pâncreas.



**Figura 22** - Expressão de VEGF em linfonodo metastático.



**Figura 23** - Gráfico da distribuição das médias de expressão de VEGF-1 nos diferentes tecidos (p=NS).



**Figura 24** - Gráfico da correlação entre expressão de VEGF e sobrevida

#### **4.9 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS MARCADORES COX-2 VEGF-1 COM AS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS**

Foi realizada avaliação estatística da correlação entre nível de expressão dos marcadores acima com as seguintes variáveis histopatológicas: Grau de Diferenciação, Invasão perineural, Invasão vascular, e número de linfonodos acometidos.

A expressão de COX -2 na população estudada demonstrou diferença estatisticamente significativa no grau de diferenciação tumoral, dessa

população estudada. Enquanto que as outras variáveis não demonstraram diferença estatisticamente significativa.

O marcador VEGF-1 não demonstrou associação com as variáveis histopatológicas estudadas nessa população.

#### 4.10 COX- 2 versus variáveis histopatológicas

Das variáveis estudadas nessa população, apenas o grau de diferenciação demonstrou correlação estatisticamente significativa, com a expressão de COX- 2, onde pode-se observar que quanto maior o grau de diferenciação, menor é a expressão de COX- 2.

**Tabela 9** - Variáveis histopatológica versus expressão de COX-2.

| <i><b>Variável</b></i>              |     | <i><b>Média de valor de expressãc</b></i> | <i><b>Desvio padrão</b></i> | <i><b>P valor</b></i> |
|-------------------------------------|-----|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <b><i>Invasão perineural</i></b>    | Sim | 1,38                                      | 0,23                        | 0,391                 |
|                                     | Não | 1,45                                      | 0,23                        |                       |
| <b><i>Linfonodos Acometidos</i></b> | Sim | 1,42                                      | 0,29                        | 0,76                  |
|                                     | Não | 1,39                                      | 0,25                        |                       |
| <b><i>Invasão Vascular</i></b>      | Sim | 1,41                                      | 0,26                        | 0,726                 |
|                                     | Não | 1,39                                      | 0,22                        |                       |
| <b><i>Grau de diferenciação</i></b> | I   | 1,34                                      | 0,15                        | P= 0,032              |
|                                     | II  | 1,43                                      | 0,25                        |                       |
|                                     | III | 1,09                                      | 0,05                        |                       |

#### 4.11 VEGF-1 versus Variáveis Histopatológicas

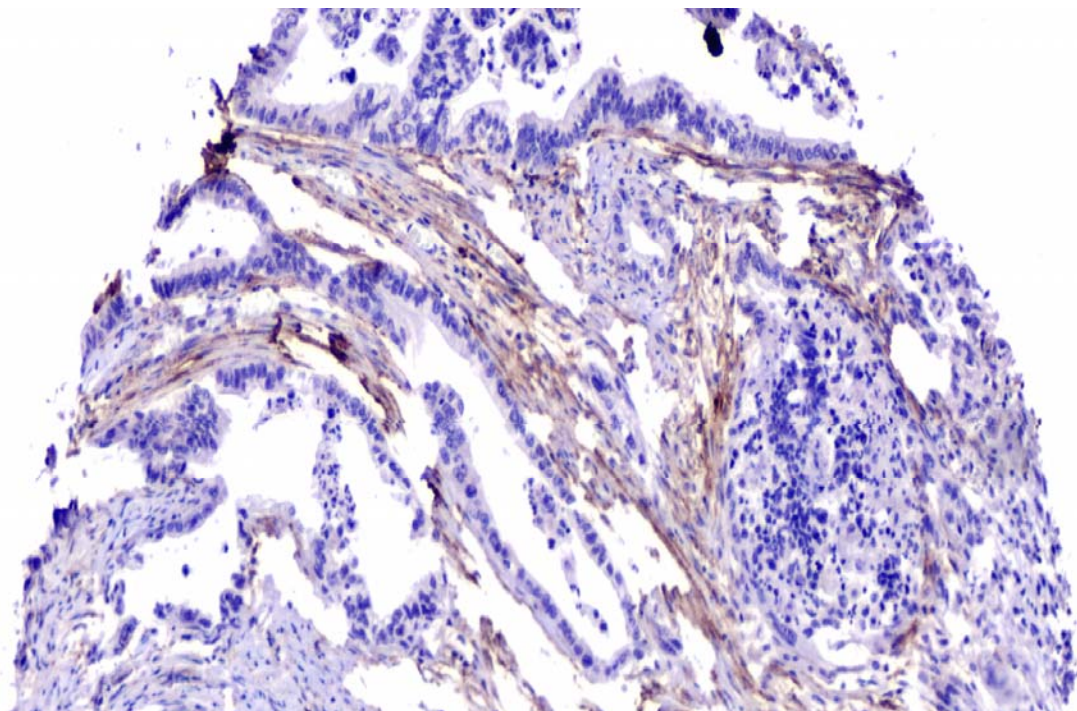
Ao compararmos os resultados da expressão de VEGF 1 nos diferentes tecidos com as variáveis histopatológicas, nessa amostra do estudo, não observamos impacto estatisticamente significativa para: Invasão perineural, linfonodos acometidos, grau de diferenciação e invasão vascular.

**Tabela 10** - VEGF versus variáveis histopatológicas.

| <i>Variável</i>                     |     | <i>MÉDIA</i> | <i>Desvio padrão</i> | <i>P valor</i> |
|-------------------------------------|-----|--------------|----------------------|----------------|
| <b><i>Invasão perineural</i></b>    | Sim | 1,37         | 0,23                 | 0,478          |
|                                     | Não | 1,31         | 0,33                 |                |
| <b><i>Linfonodos Acometidos</i></b> | Sim | 1,32         | 0,21                 | 0,25           |
|                                     | Não | 1,41         | 0,20                 |                |
| <b><i>Invasão Vascular</i></b>      | Sim | 1,32         | 0,22                 | 0,329          |
|                                     | Não | 1,39         | 0,26                 |                |
| <b><i>Grau de diferenciação</i></b> | I   | 1,32         | 0,27                 | P= 0,662       |
|                                     | II  | 1,37         | 0,25                 |                |
|                                     | III | 1,43         | 0,15                 |                |

#### 4.12 EXPRESSÃO DE D2- 40 NO ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS

O Marcador de Linfangiogene D2- 40 não mostrou- se efetivo nessa população estudada pela técnica de Tissue Array, mesmo após repetidas tentativas. As lâminas demonstraram uma coloração anômala não definindo bem os vasos linfáticos, mas demonstrando um borramento no tecido fibroconjuntivo. Dessa forma não foi possível a avaliação desse marcador sobre prognóstico, bem como a expressão nos diferentes tipos de tecidos.



**Figura 25** - Expressão de D2- 40 no tecido tumoral(marcador corando tecidos de forma desorganizada).

## 5 DISCUSSÃO

O câncer de pâncreas é uma das neoplasias de maior letalidade do trato gastrointestinal, e a sua melhor compreensão pode trazer melhora significativa para um grande número de pacientes que são diagnosticados com essa doença anualmente. Esse estudo procurou unir informações de um grupo de duas instituições que tratam essa patologia, para que possamos melhorar a qualidade da informação, por meio de uma maior casuística, tendo em vista que não há séries nacionais publicadas, com esse número de pacientes de forma individual, ou multi- institucional.

Nesse estudo abordamos aspectos clínicos, demográficos, e histopatológicos, bem como imunoistoquímicos. A análise dos fatores demográficos: sexo, idade e raça, demonstraram que nessa população estudada, o sexo esteve associado com o prognóstico. Na análise univariada, os pacientes do sexo masculino apresentaram uma sobrevida pior que as das pacientes do sexo feminino. As pacientes do sexo feminino apresentaram uma sobrevida em 24 meses de 40%, enquanto que os pacientes do sexo masculino apresentaram uma sobrevida próxima de 23% em 24 meses ( $p < 0.05$ ). Entretanto na análise multivariada, esse dado não se mostrou ser independente no prognóstico. O câncer de pâncreas é mais comum em pacientes acima dos 60 anos de idade e do sexo masculino. Nesse estudo, a idade, não esteve associada com a sobrevida, o que vai de encontro com outros estudos da literatura (GROBMYER et al. 2007).

CA 19.9 um marcador tumoral associado ao tumor de pâncreas e outros tumores do aparelho digestivo, mostrou ser uma fator prognóstico independente nessa população estudada. Esse marcador apresenta um Odds ratio de 3,2 nos pacientes onde este valor estava acima de 75 UI/ml ( $p=0,04$ ). Esse resultado vai de encontro a vários estudos, demonstrando que o nível de CA 19.9 está relacionado com a presença de metástases no momento do diagnóstico, bem como se trata de um fator prognóstico de sobrevida (GARCEA et al. 2007; PAPADONIOU et al. 2008; MÜLLER et al. 2008). Esse marcador é usado também na avaliação de resposta ao tratamento sistêmico nos pacientes portadores de câncer avançado, sendo que uma diminuição acima de 50% do valor inicial está associado a uma melhor resposta ao tratamento (HESS et al. 2008). Nessa população esse resultado pode estar associado com a sobrevida, até mesmo por tratar-se de uma casuística que envolve pacientes em um intervalo grande de tempo, onde a qualidade do estadiamento pode ter variado ao longo do tempo devido a limitações técnicas dos exames de imagem, por exemplo.

Dentre as características histopatológicas estudadas, chama a atenção os resultados de grau de diferenciação e invasão perineural. No nosso estudo, o grau de diferenciação esteve relacionado com o prognóstico, sendo que quanto mais indiferenciado era o tumor, pior era o prognóstico dos pacientes. Enquanto os pacientes com tumores bem diferenciados apresentavam um OR de 2,93, os pacientes com tumores indiferenciados, apresentavam OR de 13,65 ( $p=0,041$ ). Esse resultado encontra dados semelhantes na literatura, conforme publicado por diversos autores em outro

momento (GEER e BRENNAN 1993; CONLON et al. 1996; YEO et al. 1997; SCHMIDT et al. 2004).

A invasão perineural também esteve fortemente associada ao prognóstico nos pacientes estudados, a presença de invasão perineural está associada ao prognóstico desfavorável, nos pacientes operados por adenocarcinoma do pâncreas com um OR 13,93 ( $p=0,014$ ). Estes dados já foram observados na literatura em estudos anteriores (CONLON et al. 1996; NAKAO et al. 1996; NIMURA et al. 2002; PERINI 2005).

Os resultados obtidos nesse estudo são comparáveis as principais séries internacionais, com uma chance de sobrevivência em 5 anos de 13% nos pacientes operados, e uma sobrevida média em 36 meses de 20%. Várias modalidades terapêuticas estiveram associadas a esses pacientes durante o período estudado: quimioterapia adjuvante, quimioterapia com radioterapia, e até modalidades de tratamento neoadjuvante. Os principais ensaios clínicos da literatura, ainda falharam em determinar uma modalidade terapêutica que pudesse causar grande impacto na sobrevivência dos pacientes com adenocarcinoma de pâncreas. Apesar dos esforços de vários pesquisadores nas últimas décadas a sobrevida dos pacientes não sofreu diferença significativa, apresentando sobrevida média de 20 meses (KALSER e ELLENBERG 1985; INKENBIJL et al. 1999; NEPTOLEMOS et al. 2004; REGINE et al. 2006; OETTLE et al. 2007).

Um dado que chama atenção nesse estudo é que o estadiamento patológico não esteve associado ao prognóstico, entretanto acreditamos que isso se deva ao número pequeno de pacientes. Assim os grupos não fora

comparados, entretanto ao avaliarmos os pacientes em grupos de estadiamento similar, este fator ofereceu significância, que vem de encontro a vários estudos na literatura. Embora sempre valha ressaltar que diferente de outros tumores, no adenocarcinoma de pâncreas, é difícil determinar um grupo com melhor prognóstico.

As variáveis clínicas como icterícia, e emagrecimento, não estiveram associadas com o prognóstico, como poderia se esperar, essas características podem estar associados a maior morbidade do tratamento cirúrgico, e consequentemente maior mortalidade pós- operatória (GEER e BRENNAN 1993; CAMERON et al. 2006). Entretanto quando se excluem esses pacientes para análise de sobrevida, fica claro que isso não é um fator de risco para recorrência, pois uma vez ultrapassado esse momento, a sobrevida dos pacientes é semelhante.

Embora a avaliação de VEGF não apresentasse impacto na sobrevida da população estudada nesse estudo, bem como não mostrou diferença de expressão entre os diferentes tipos de tecido estudado, outros estudos da literatura demonstraram dados bastante interessantes e consistentes a cerca desse estudo.

Em um estudo conduzido por NIEDERGETHMANN et al. (2002) os autores analisaram a expressão de VEGF e, microdensidade vascular, com recorrência precoce e prognóstico após tratamento cirúrgico com intuito curativo. Esses autores demonstraram que na população estudada densidade microvascular estava associada com estadiamento, e mais,

expressão de VEGF estava associada com a intensidade de densidade microvascular.

Um aspecto extremamente importante nesse estudo é que expressão de VEGF foi um fator independente no prognóstico dos pacientes operados, após análise multivariada ( $p=0,003$ ). Um aspecto que pode explicar a falta de impacto no nosso estudo é que um grande número de pacientes tinham seus blocos armazenados a bastante tempo, o que pode prejudicar a utilização desse material biológico.

O nosso estudo avaliou o impacto da expressão de COX- 2 em relação a diferentes tecidos pancreáticos: tecido tumoral, linfonodo acometido por tumor e tecido normal. Nessa série, a expressão de COX-2 não mostrou diferença estatisticamente significativa, entre esses tecidos. Apesar disso, COX- 2 já foi estudado pelo mesmo método automatizado de imunohistoquímica, em particular em pacientes com lesões que estão associados ao processo de malignização em câncer de pâncreas. Em estudo bastante elegante, MAITRA et al. (2002) demonstraram que amostras de PANIN apresentaram expressão maior de COX-2, quando comparados ao tecido normal. E da mesma forma, amostras com Adenocarcinoma apresentam maior expressão de COX- 2 quando comparadas com tecido normal. Isso abre espaço para estudos de intervenção com inibidores de COX-2, para quimioprevenção, bem como associação com quimioterápicos já em uso (MATSUBAYASHI et al. 2007; MATSUMOTO et al. 2007). No estudo atual, embora essa associação não tenha sido estudada, houve uma clara tendência de associação da expressão de COX-2 , com sobrevida dos

pacientes operadas, embora não tenha atingido significância estatística, as curvas tendem a se separar ao longo do tempo.

É importante ressaltar ainda a associação de diferentes níveis de COX-2 com aspectos histopatológicos como grau de diferenciação. Na população estudada no presente estudo, a expressão de COX-2 esteve associada com grau de diferenciação, sendo que estava mais expressa em tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados (1,34 e 1,44, respectivamente), enquanto que os tumores mais indiferenciados apresentavam um valor médio de 1,04 ( $p < 0.05$ ). Tendo em vista que o grau de diferenciação III tende estar associado com pior prognóstico e o nosso próprio estudo sugira que aumento da expressão de COX-2 pode estar associado ao prognóstico, esperava-se que nessa população de tumores indiferenciados a expressão fosse maior. Entretanto outro estudo que avaliou a expressão de COX-2 em modelos animais experimentais com tumores induzidos demonstrou que COX-2 pode estar associado às formas mais bem diferenciadas neoplasia intraepitelial pancreática, e diminuindo em formas mais severas (CROWELL et al. 2006), isso desperta ainda a nossa atenção para esse tema e orienta a necessidade de outros estudos. Além disso, esse autor conseguiu demonstrar que ocorria a diminuição da expressão de COX-2 quando as cobaias eram tratadas com um inibidor de COX-2, embora isso não tenha diminuído a incidência de tumor invasivo.

## 6 CONCLUSÃO

- 1 O objetivo de criar um banco de dados, e de blocos de parafina em comum, entre as duas instituições foi atingido.
- 2 Na análise Univariada: Sexo, Nível de Bilirrubina, Grau de Diferenciação e Invasão perineural, são fatores de risco para morte por câncer de pâncreas na população estudada;
- 3 Na análise Multivariada, Sexo, CA 19.9, Grau de diferenciação e Invasão Perineural mostraram impacto na sobrevida;
- 4 Os marcadores de imunoistoquímica VEGF1 e COX-2 não mostraram impacto na sobrevida dos pacientes com Câncer de Pâncreas estudados nesse estudo.
- 5 O marcador D2- 40 não foi efetivo nessa amostra estudada para análise quantitativa que impossibilitou estudar o impacto desse marcador na população estudada;
- 6 Grau de diferenciação apresenta correlação significativa com a expressão de COX-2.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albazaz R, Verbeke CS, Rahman SH, McMahon MJ. Cyclooxygenase-2 expression associated with severity of PanIN lesions: a possible link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. **Pancreatology** 2005; 5:361-9.

Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. **Science** 1999; 284:808-12.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

Büchler P, Reber HA, Büchler MW, Friess H, Hines OJ. VEGF-RII influences the prognosis of pancreatic cancer. **Ann Surg** 2002; 236:738-49; discussion 749.

Burris H 3rd, Rocha-Lima C. New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. **Oncologist** 2008; 13:289-98.

Cabebe E, Fischer GA. Clinical trials of VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors in pancreatic cancer. **Expert Opin Investig Drugs** 2007; 16:467-76.

Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. **Ann Surg** 2006; 244:10-5.

Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma: clinicopathologic analysis of 5-year survivors. **Ann Surg** 1996; 223:273-9.

Cooperman AM. Pancreatic cancer: the bigger picture. **Surg Clin North Am** 2001; 81:557-74.

Crowell PL, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Savage JJ, Hertzler DA 2nd, Cummings WO. Cyclooxygenase-2 expression in hamster and human pancreatic neoplasia. **Neoplasia** 2006; 8:437-45.

DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. **Gastroenterology** 1999; 117:1464-84.

Farnell M, Pearson R, Sarr M, et al. A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in respectable pancreatic head adenocarcinoma. **Surgery** 2005; 138:618-30.

Garcea G, Dennison AR, Ong SL, et al. Tumour characteristics predictive of survival following resection for ductal adenocarcinoma of the head of pancreas. **Eur J Surg Oncol** 2007; 33:892-7.

Geer RJ, Brennan MF. Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. **Am J Surg** 1993; 165:68-72.

Grobmyer SR, Pieracci FM, Allen PJ, Brennan MF, Jaques DP. Defining morbidity after pancreaticoduodenectomy: use of a prospective complication grading system. **J Am Coll Surg** 2007; 204:356-64.

Hermanova M, Trna J, Nenutil R, Dite P, Kala Z. Expression of COX-2 is associated with accumulation of p53 in pancreatic cancer: analysis of COX-2 and p53 expression in premalignant and malignant ductal pancreatic lesions. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2008; 20:732-9.

Hess V, Glimelius B, Grawe P, et al. CA 19-9 tumour-marker response to chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer enrolled in a randomised controlled trial. **Lancet Oncol** 2008; 9:132-8

Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes Dev** 2006; 20:1218-49.

Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:3502-8.

Jimeno A, Amador ML, Kulesza P, et al. Assessment of celecoxib pharmacodynamics in pancreatic cancer. **Mol Cancer Ther** 2006; 5:3240-7.

Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. **J Clin Pathol** 2006; 59:382-6.

Kalser MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer: adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. **Arch Surg** 1985; 120:899-903. Erratum in: Arch Surg 1986 Sep;121.

Kim WH, Rubin MA, Dunn RL. High-density tissue microarray. **Am J Surg Pathol** 2002; 26:1236-8; discussion 1237-8.

Kindler HL, Friberg G, Singh DA, et al. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:8033-40.

Klinkenbijnl JH, Jeekel J, Sahmoud T, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluoracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. **Ann Surg** 1999; 230:776- 82.

Kloppel G. Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: Hamilton SR, Aeltonen LA, editors. **Pathology of tumors of the digestive tract**. Lyon-France: IARC; 2000. (World Health Organization Classification of Tumors)

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Maitra A, Ashfaq R, Gunn CR, et al. Cyclooxygenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging. **Am J Clin Pathol** 2002; 118:194-201.

Matsubayashi H, Infante JR, Winter J, et al. Tumor COX-2 expression and prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. **Cancer Biol Ther** 2007; 6:1569-75.

Matsumoto G, Muta M, Tsuruta K, Horiguchi S, Karasawa K, Okamoto A. Tumor size significantly correlates with postoperative liver metastases and COX-2 expression in patients with resectable pancreatic cancer. **Pancreatol** 2007; 7:167-73.

Müller MW, Friess H, Köninger J, et al. Factors influencing survival after bypass procedures in patients with advanced pancreatic adenocarcinomas. **Am J Surg** 2008; 195:221-8.

Nakao A, Harada A, Nonami T, Kanedo T, Takagi H. Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. **Pancreas** 1996; 12:357-61.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Dunn JA, et al. Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. **Ann Surg** 2001; 234:758-68.

Niakosari F, Kahn HJ, Marks A, From L. Detection of lymphatic invasion in primary melanoma with monoclonal antibody D2-40: a new selective immunohistochemical marker of lymphatic endothelium. **Arch Dermatol** 2005; 141:440-4.

Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wostbrock B, et al. High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. **Pancreas** 2002; 25:122-9.

Nimura YN, Kato H, Miyagawa S, et al. Standard versus extended lymphadenectomy in pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer: a multicentric, randomized controlled trial. **Pancreatology** 2004; 4:4040.

Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant chemotherapy with Gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. **JAMA** 2007; 297:267-77.

Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. **Science** 2002; 296:1883-6.

Papadoniou N, Kosmas C, Gennatas K, et al. Prognostic factors in patients with locally advanced (unresectable) or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a retrospective analysis. **Anticancer Res** 2008; 28:543-9.

Pedrazolli S, DiCarlo V, Diognigi R, et al. Standard vs extended lymphadenectomy associated with pancreatoduodenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas. **Ann Surg** 1998; 228:508-17.

Perini MV. **Estudo dos fatores clinico-patológicos no prognóstico de pacientes submetidos a ressecção de adenocarcinoma pancreático**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]

Regine WF, Winter KW, Abrams R, et al. A. Rich RTOG 9704 a phase III study of adjuvant pre and post chemoradiation (CRT) 5-FU vs. gemcitabine (G) for resected pancreatic adenocarcinoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:4007.

Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. **Clin Cancer Res** 2004; 10:3069-75.

Riess H. Antiangiogenic strategies in pancreatic cancer: recent results **Cancer Res** 2008; 177:123-9.

Schmidt CM, Powell ES, Yiannoutsos CT, et al. Pancreaticoduodenectomy: a 20 year experience in 516 patients. **Arch Surg** 2004; 139:718-25.

Seiler CA, Wagner M, Bachmann T, et al. Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection-long term results. **Br J Surg** 2005; 92:547-56.

Seo Y, Baba H, Fukuda T, et al. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. **Cancer** 2000; 88:2239-45.

Tarbé N, Lösch S, Burtscher H, Jarsch M, Weidle UH. Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. **Anticancer Res** 2002; 22:2015-27.

Xu XF, Xie CG, Wang XP, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. **Tohoku J Exp Med** 2008; 215:149-57.

Wey JS, Fan F, Gray MJ, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. **Cancer** 2005; 104:427-38.

Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, et al. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. **Cancer Res** 1993; 53:5289-96.

Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. **Cancer Res** 2001; 61:5284-8.

Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, et al. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas, 201 patients. **Ann Surg** 1995; 221:721-31; discussion 731-3.

Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, et al. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. **Ann Surg** 1997; 226:248-57; discussion 257-60.

Zhang B, Zhao WH, Zhou WY, Yu WS, Yu JM, Li S. Expression of vascular endothelial growth factors-C and -D correlate with evidence of lymphangiogenesis and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Detect Prev** 2007; 31:436-42.

***ANEXOS***

---

## Anexo 1 - Protocolo do Levantamento Retrospectivo dos Dados

- 1) Nome: \_\_\_\_\_ 2) RGH: \_\_\_\_\_ 3) AP: \_\_\_\_\_
- 4) Tipo de Cirurgia: ( ) GDP ( ) DP ( ) Panc Corpo-Caudal
- 5) Veia Porta: ( ) sim ( ) não 6) Data da Cirurgia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 7) Idade: \_\_\_\_
- 8) Sexo: ( ) masc ( ) fem 9) Cor: ( ) Branco ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Pardo
- 10) Emagrecimento: : ( ) sim ( ) não 11) Qto?: \_\_\_\_\_
- 12) Obstrução Gástrica: ( ) sim ( ) não 13) Glicemia: \_\_\_\_\_
- 14) Bilirrubina: \_\_\_\_\_ 15) CEA: \_\_\_\_\_ 16) CA 19-9: \_\_\_\_\_
- 17) Dor: : ( ) sim ( ) não 18) Qto tempo: \_\_\_\_\_
- 19) Tipo: \_\_\_\_\_
- 20) Local: \_\_\_\_\_ 21) Tamanho: \_\_\_\_\_
- 22) Linfonodo comprometido: ( ) sim ( ) não 23) Linf Dissec: \_\_\_\_\_
- 24) Inv Vasc: ( ) sim ( ) não 25) Inv Neural: ( ) sim ( ) não
- 26) Congelação: ( ) Neo maligna ( ) Neo benigna 27) Tempo cirúrgico: \_\_\_\_\_
- 28) Tf Sangue: ( ) sim ( ) não 29) Unidades: \_\_\_\_\_ 30) AP: \_\_\_\_\_
- 31) Diferen: \_\_\_\_\_ 32) T\_\_\_\_ N\_\_\_\_ M\_\_\_\_ 33) Estádio: \_\_\_\_\_
- 34) No AP: \_\_\_\_\_ 35) Perman SNG: ( ) sim ( ) não
- 36) Realiment: \_\_\_\_\_ 37) ATB: ( ) sim ( ) não
- 38) Complicações: ( ) sim ( ) não 39) Qual: \_\_\_\_\_
- 40) Fístula Pancreática: ( ) sim ( ) não 41) Retardo Gástrico: ( ) sim ( ) não
- 42) Infecção: ( ) sim ( ) não 43) Sangramento: ( ) sim ( ) não 44) Alta PO: \_\_\_\_
- 45) Data Alta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 46) Reop: ( ) sim ( ) não
- 47) Data Reop: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 48) Óbito Hospitalar: ( ) sim ( ) não
- 49) Adjuvância: ( ) sim ( ) não
- QT 50) ( ) sim ( ) não
- 51) ( ) 5-fu ( ) Lucovorin ( ) Genzar ( ) Outro: \_\_\_\_\_
- 52) Sessões: \_\_\_\_\_ 53) Dose: \_\_\_\_\_
- RDT 54) ( ) sim ( ) não 55) Dose: \_\_\_\_\_
- 56) QT e RDT: ( ) sim ( ) não
- 57) STATUS: ( ) Morto pela Doença ( ) Vivo com a Doença  
( ) Morto por Outras Causas ( ) Vivo sem a Doença
- 58) Data da Última Consulta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
- 59) Data do Óbito: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
- 60) Telefone: \_\_\_\_\_

## Anexo 2 - Carta de aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 22 de Julho de 2008.

Ao  
**Dr. André Luis Montagnini**

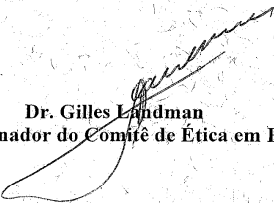
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1096/08**  
**“Análise da expressão de marcadores imunohistoquímicos relacionados a angiogênese (VEGF), linfagiogênese (CD2-40) e inflamação (COX-2) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 08/07/2008 aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de compromisso do pesquisador com resoluções do CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Gilles Lindman**  
**Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**



## **Parecer Consubstanciado**

**Projeto:** 1096/08

**Título:** "Análise da expressão de marcadores imunohistoquímicos relacionados a angiogênese (VEGF), linfangiogênese (CD2-40) e inflamação (COX-2) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo".

**Pesquisador Responsável:** Dr. André Luis Montagnini

**Pesquisadores associados:** Dr. Fernando Augusto Soares e Dr. Venâncio Alves F. Avancini (HC-FMUSP)

**Aluno:** Alessandro Landskron Diniz (Mestrado)

### **Comentários Gerais: Riscos e Benefícios aos Sujeitos:**

Os objetivos são pertinentes. Pretende-se avaliar a expressão de marcadores de imunohistoquímica relacionados com Linfangiogênese, Angiogênese e Inflamação em tecidos tumorais e não tumorais de pâncreas e de linfonodos acometidos e não acometidos. Os dados de expressão proteica serão associados com características clínicas e anatomo-patológicas. Serão utilizadas 100 amostras, 20 do Hospital A.C. Camargo e 80 do HCFMUSP. O projeto já possui aprovação do CEP da instituição sede.

### **Adequação do Título:**

Adequado.

### **Adequação da revisão da literatura:**

Adequada.

### **Adequação dos objetivos frente à literatura:**

Adequados.

### **Desenho e metodologia do projeto:**

Adequado.

### **Local de Pesquisa:**

Hospital A.C. Camargo e HCFMUSP.

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:**

Por se tratar de pesquisa retrospectiva com amostras do banco de tecidos fixados, pede dispensa. Adequada.

### **Parecer Final:**

Projeto Aprovado.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE  
Hospital A.C. Camargo  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Dr. Gilles Landman  
Vice - Coordenador