Marcos Vinicius Perini

**Análise da expressão do receptor do fator
de crescimento epitelial (EGFR) em
pacientes portadores de adenocarcinoma
pancreático submetidos a tratamento
cirúrgico com intuito curativo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho
Digestivo

Orientador: Dr. André Luis Montagnini

**São Paulo
2009**

Perini, MV. Análise da expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. 2009.

Marcos Vinicius Perini

**Análise da expressão do receptor do fator
de crescimento epitelial (EGFR) em
pacientes portadores de adenocarcinoma
pancreático submetidos a tratamento
cirúrgico com intuito curativo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho
Digestivo

Orientador: Dr. André Luis Montagnini

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Perini, Marcos Vinicius

Análise da expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em
pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento
cirúrgico com intuito curativo / Marcos Vinicius Perini. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: André Luis Montagnini.

Descritores: 1.Genes erbB-1 2.Receptor do fator de crescimento epidérmico

3.Adenocarcinoma 4.Neoplasias pancreáticas 5.Sobrevida

6.Pancreaticoduodenectomy

Dedicatória

*A meu pai, antes de tudo meu melhor amigo, exemplo maior de
médico e homem...*

A minha querida mãe, por seu carinho irrestrito, sempre presente.

*A Fabiola, por abdicar de minha presença tantas vezes, por trilharmos
juntos nosso caminho, por ser minha companheira nos bons e maus
momentos, por ser uma mãe tão especial...*

*Ao Lucca e ao Rafael, pela felicidade imensurável
que trouxeram à minha vida.*

A meus irmãos e sobrinhos, pela alegria que me trazem.

Agradecimentos

Ao Dr. André Montagnini, mentor e incentivador deste trabalho, pelo convívio e amizade prestados em todos os momentos.

Ao Prof. Ivan Cecconello pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Luiz A. Carneiro D’Albuquerque, pelo incentivo, oportunidade e apoio irrestrito que me foram oferecidos.

Ao Prof. Dr. Paulo Herman, pelo convívio, amizade e ensinamentos.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Fábio Pinatel Lopasso, que desde acadêmico sempre me incentivou e acolheu; exemplo de cirurgião, pesquisador e pessoa.

Aos mais que amigos do Serviço de Cirurgia de Vias Biliares Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha, Dra. Sonia Penteado, Dr. José Jukemura, Dr. Emilio Abdo, Dr. André Matheus Siqueira, Dra Luciana Haddad e Dr Emerson Abe pelo convívio e ensinamentos adquiridos.

Ao Dr. Alessandro Diniz, amigo e companheiro na realização deste trabalho.

A Dra Renata Coudry, pela realização de grande parte deste trabalho, pelo seu tempo despendido e pela atenção em todos os momentos.

Ao meu professor dos tempos de Colégio Marista e de sempre, Ir. Josué Virgílio Balestro, exemplo de ser humano, pelos ensinamentos e amizade nesses anos.

Aos colegas e companheiros de trabalho, Dr Felipe Coimbra, Dr Wilson Costa e Dr. Heber Salvador.

A Dra. Roseli Patzina pela incansável revisão das lâminas, sugestões e apoio.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pela colaboração irrestrita na realização do projeto.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares pela oportunidade da realização deste trabalho.

“VIAM AUT INVENIAM AUT FACIAM”

“Eu encontro o caminho ou o faço”

Atribuído a Aníbal Barca, comandante militar cartaginês

247 a.C. – 183 a. C.

Normatização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	20
3. MÉTODOS.....	22
3.1 Dados demográficos.....	24
3.2 Patologia clínica.....	24
3.3 Tratamento cirúrgico e ressecção da veia porta.....	24
3.4 Anatomia patológica.....	25
3.5 Análise imuno-histoquímica	28
3.5.1 Tissue micro array	28
3.5.2 Receptor do fator de crescimento epitelial.....	29
3.6 Sobrevida	35
3.7 Análise estatística	35
4. RESULTADOS.....	37

4.1	Dados demográficos.....	38
4.2	Patologia clínica.....	39
4.3	Tratamento cirúrgico e ressecção da veia porta.....	40
4.4	Anatomia patológica.....	41
4.5	Expressão do EGFR na membrana celular	44
4.6	Expressão do EGFR no citoplasma celular	47
4.7	Sobrevida	48
4.8	Variável gênero	55
5.	DISCUSSÃO.....	58
6.	CONCLUSÕES.....	75
7.	REFERÊNCIAS.....	77
8.	APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	quinase PI-3 dependente da serina-treonina quinase
ATP	adenosina tri-fosfato
bFGF	fator de crescimento básico de fibroblasto
CaPa	câncer do pâncreas
CEA	antígeno cárcinoembrionário
DPT	duodenopancreatectomia com preservação do piloro
EGF	fator de crescimento epitelial
EGFR	receptor do fator de crescimento epitelial
GDP	gastroduodenopancreatectomia
HB-EGFR	fator de crescimento epitelial ligador de heparina,
HER	receptor epitelial humano
IHQ	imuno-histoquímica
IMOS	insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas
MAPK	proteína quinase ativadora de mitose
N	número de pacientes
p	nível de significância
P	fósforo
PCC	pancreatectomia corpo-caudal
PI3K	fosfatidil inositol 3,4,5 quinase
PO	dia de pós-operatório
PT	pancreatectomia total

R0	ressecção sem lesão microscópica residual
R1	ressecção com lesão microscópica residual
R2	ressecção com lesão macroscópica residual
Raf	serina-quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora da MAP quinase
SOS	fator ativador do Ras, com homologia a <i>Son-of-sevenless</i>
TGF	fator de transformação de crescimento
TKI	inibidor da tirosina quinase
VEGF	fator de crescimento endotelial
VP	veia porta

LISTA DE SIGLAS

A.C. Camargo	Antonio Cândido Camargo
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
SCVBP	Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas
TNM	Tumor, linfonodo e metástases
UICC	União Internacional contra o Câncer

LISTA DE SÍMBOLOS

%	per cento
<	menor que
>	maior que
=	igual a
cm	centímetros
g/dl	gramas por decilitro
g/l	gramas por litro
m	meses
mg/dl	miligramas por decilitro
N	número de pacientes
min	minutos
ml	mililitros
ng	nanogramas
kDa	quilo daltons
U	unidades

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Graduação histopatológica do adenocarcinoma pancreático....	26
Quadro 2 -	Classificação da União Internacional contra o Câncer em relação ao tamanho tumoral, acometimento linfonodal e metástase à distância.....	27
Quadro 3 -	Estadiamento do adenocarcinoma pancreático preconizado pela UICC	28
Quadro 4 –	Classificação da expressão do HER2	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Receptores da família do EGF (EGFR ou HER1, HER2, HER3, HER4) apresentando sítio de ligação extracelular, porção transmembrana e domínio tirosino quinase intracelular.....	10
Figura 2 -	Mecanismo de ação dos receptores de crescimento epitelial e suas respectivas vias de sinalização intracelular	12
Figura 3 -	Mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-EGFR e dos inibidores da tirosina quinase (EGFR-TKIs).....	16
Figura 4 -	Mecanismo de ativação da citotoxicidade mediada por células (A) e por anticorpos (B).....	18
Figura 5 -	Fotomicrografia de epitélio ductal normal do pâncreas	33
Figura 6-	Fotomicrografia de adenocarcinoma de pâncreas exibindo expressão positiva para EGFR na membrana e no citoplasma (40x)	34
Figura 7-	Fotomicrografia de tecido metastático linfonodal de adenocarcinoma de pâncreas exibindo expressão positiva para EGFR na membrana e no citoplasma (40x)	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica segundo gênero, idade e raça.....	38
Tabela 2 - Distribuição dos resultados de patologia clínica de pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.....	39
Tabela 3 - Tipo de ressecção pancreática realizadas em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático e sua distribuição em relação à ressecção da veia porta	40
Tabela 4 - Grau de diferenciação tumoral dos adenocarcinomas ductais em pacientes submetidos à ressecção cirúrgica	41
Tabela 5 - Distribuição da diferenciação tumoral em relação ao tamanho, acometimento linfonodal e estágio clínico em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.....	42
Tabela 6 - Distribuição da diferenciação tumoral em relação às variáveis patológicas dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica	43
Tabela 7 - Expressão do EGFR na membrana celular da região tumoral, não tumoral e metastática linfonodal em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica	45
Tabela 8 - Expressão do EGFR na membrana celular dos tecidos tumoral, não tumoral e metastático linfonodal em relação às diferentes variáveis clínico-patológicas de pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica	46
Tabela 9 - Expressão do EGFR no citoplasma celular na região tumoral, não tumoral e metastática linfonodal em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica	47

Tabela 10 - Sobrevida média (em meses) por estágio clínico em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.....	48
Tabela 11 - Variáveis clínicas e patológicas que apresentaram correlação com a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica na análise univariada	51
Tabela 12 - Variáveis sem correlação com a sobrevida dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático na análise univariada	52
Tabela 13 - Sobrevida global dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático sobreviventes em 1 ano, 3 anos, 5 anos e global quanto à expressão de EGFR na membrana no tecido tumoral .	54
Tabela 14 - Sobrevida média e mediana globais (em meses) dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático quanto à expressão de membrana do EGFR no tecido tumoral	54
Tabela 15 - Variáveis clínicas e patológicas que apresentaram correlação com a sobrevida dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica com intuito curativo na análise multivariada - regressão de Cox	55
Tabela 16 - Comparação entre o gênero e as variáveis demográficas e de anatomia clínica – teste exato de Fischer	56
Tabela 17 - Comparação entre o gênero e as variáveis anátomopatológicas teste exato de Fischer.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.....	49
Gráfico 2 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica quanto ao estágio (TNM).....	50
Gráfico 3 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica quanto à expressão de EGFR na membrana celular do tecido tumoral	53

RESUMO

Perini MV. *Análise da expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo.* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009, 90p.

INTRODUÇÃO: O câncer do pâncreas apresenta taxas anuais de mortalidade e incidência muito semelhantes, sendo uma das principais causas de morte por câncer no mundo. A agressividade do tumor e o retardo no seu diagnóstico são considerados responsáveis pela sua alta letalidade. O tratamento adjuvante convencional aumenta pouco a sobrevida a longo prazo e a terapia-alvo pode ser uma alternativa ao tratamento deste tipo de tumor. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo é avaliar a expressão do receptor do fator de crescimento epitelial e seu eventual valor prognóstico em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica. **MÉTODO:** Foram estudados retrospectivamente 88 pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático operados no Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do HC-FMUSP e no Departamento de Cirurgia Abdominal – Hospital A.C. Camargo no período de 1990 a 2006. **RESULTADOS:** Quarenta e sete (53,4%) pacientes do sexo feminino e 41 (46,6%) do masculino com idade mediana de 60 anos. As cirurgias realizadas foram duodenopancreatectomia com preservação do piloro (55,1%), gastroduodenopancreatectomia (34,8%), pancreatectomia corpo-caudal (6,8%) e gastroduodenopancreatectomia total (2,3%). A ressecção venosa portal foi realizada em 12 pacientes (13,5%). O tamanho tumoral médio foi de 3,75cm. Invasão vascular esteve presente em 31% dos casos e neural em 88,5%. A margem de ressecção estava comprometida em 33 pacientes (37,5%). Cinco (5,7%) pacientes eram do estágio IA, 15(17%) do IB, 19(21,6%) do IIA, 47(53,4) do IIB e dois (2,3%) do III. Observou-se diferença na expressão de EGFR na membrana celular entre o tecido tumoral e o tecido não tumoral ($p=0,004$); entre o tecido metastático linfonodal e o tecido não tumoral ($p=0,02$) mas não houve diferença quanto à sua expressão quando comparamos o tecido tumoral e o tecido metastático linfonodal ($p=0,28$). Dentre as variáveis clínicas e patológicas estudadas, observou-se diferença de expressão do EGFR entre os gêneros feminino e masculino ($p=0,03$), não havendo diferenças entre as outras variáveis. A sobrevida mediana global foi de 22,9 meses. A sobrevida cumulativa global em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 48%, 20% e 18%, respectivamente. As sobrevidas cumulativas em 1 ano, 3 anos e 5 anos foram 77%, 30% e 8% no grupo sem expressão do EGFR na membrana tumoral versus 46%, 8% e 0% respectivamente no grupo com expressão do EGFR na membrana celular do tumor. Na análise univariada, as seguintes variáveis estiveram associadas a menor sobrevida: sexo masculino, ressecção venosa portal, invasão peri-neural,

e vascular, invasão do tecido peri-pancreático, acometimento da margem de ressecção pancreática e expressão positiva de EGFR no tecido tumoral. Na análise multivariada, os fatores associados à sobrevida menor foram: gênero masculino, ressecção venosa portal, invasão vascular e invasão peri-neural. **CONCLUSÃO:** A expressão do EGFR na membrana celular é significativamente maior no tecido tumoral que no tecido pancreático não tumoral. A expressão do EGFR na membrana celular do tecido tumoral está associada a pior prognóstico (menor sobrevida).

Descritores: receptor do fator de crescimento epidemal, adenocarcinoma, neoplasias pancreáticas, sobrevida, pancreaticoduodenectomia..

SUMMARY

Perini, MV. *EGFR expression in pancreatic cancer patients submitted to surgical resection*. [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2009, 90p.

INTRODUCTION: Pancreatic cancer is one of the main cancer related deaths in the world and its incidence is similar to its mortality. Biological aggressiveness and delayed diagnosis are a major concern. Adjuvant treatment has little impact on survival and the expression of potential target molecules has been undertaken in order to increase survival. **OBJECTIVE:** The aim of the present study is to study the expression of EGFR and its potential prognostic role in tumor, non-tumor and metastatic lymph node tissues of patient with pancreatic adenocarcinoma treated with surgical resection. **MATERIAL AND METHODS:** Eighty eight patients with pancreatic adenocarcinoma operated at "Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do HC-FMUSP" and "Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital A.C.Camargo" were retrospectively studied between 1990 and 2003. **RESULTS:** Forty seven females (53,4%) and 41 males (46,6%) with median age of 60 years were studied. Pylorus preserving duodenopancreatectomy was performed in 55%, classical duodenopancreatectomy in 34,8%, distal pancreatectomy in 6,8% and total pancreatectomy in 2,3%. Portal vein resection was performed in 12 patients (13,5%). Mean tumor size was 3,75cm. Vascular and neural invasion were present in 31% and 88,5%, respectively. Positive surgical margin was present in 33 (37,5%) patients. Five (5,7%) patients were stage IA, 15(17%) stages IB, 19(21,6%) stages IIA, 47(53,4%) stages IIB and two (2,3%) stages III. There were difference in the membrane expression of EGFR between tumor and non tumor pancreatic tissue ($p=0,004$); between metastatic lymph node and non tumor pancreatic tissue ($p=0,02$); but there were no difference between tumor and metastatic lymph node tissue ($p=0,28$). Median survival time was 22,9 months. Cumulative one, three and five years survival were 48%, 20% and 18%. Cumulative survival at 1, 3 and 5 years were 77%, 30% and 8% in patients with negative expression of EGFR in tumor membrane and 46%, 8% and 0%, respectively in patients with positive EGFR expression in tumoral membrane. Univariate analysis showed that male gender, portal vein resection, neural, vascular and peri-pancreatic invasion, positive surgical margin and positive membrane EGFR expression in tumoral tissue were correlated with poor survival. Multivariate analysis showed that male gender, portal vein resection, vascular invasion and peri-neural invasion are associated with lower survival after resection. **CONCLUSION:** EGFR membrane expression is different between tumor tissue and non tumor pancreatic tissue. EGFR membrane expression in tumoral tissue was associated with worst survival.

Descriptors: epidermal growth factor receptor, adenocarcinoma, pancreas, survival, pancreaticoduodenectomy.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer do pâncreas ocupa o quarto lugar como causa de morte por câncer nos Estados Unidos da América (EUA) e o sexto no Reino Unido, representando 10,4% dos tumores do aparelho digestivo (Parker, Tong et al. 1996). Nos EUA cerca de 37.680 casos novos (18.770 homens e 18.910 mulheres) foram diagnosticados em 2008; 34.290 pacientes (17.500 homens e 16.790 mulheres) morreram por este tipo de tumor (www.cancer.gov/cancertopics/types/pancreatic). No Brasil, o CaPa representa 2% de todos os tipos de câncer e é responsável por 4% de todas as mortes por câncer (Pinto 1991). Moraes (2002), estudando a evolução do padrão alimentar e a mortalidade por câncer de pâncreas nas capitais do Brasil, observou comportamento ascendente das taxas de mortalidade, padronizadas por idade para câncer de pâncreas, correspondendo a incremento médio anual de 1,31 por cento no período analisado. Os valores mais elevados foram encontrados nas regiões Sul e Sudeste (7,05/100.000 em Porto Alegre; 4,13/100.000 no Rio de Janeiro) (Moraes 2002).

No município de São Paulo, no período de 1997 a 1998, a incidência de câncer de pâncreas foi de 6,4 casos/100.000 habitantes para o gênero masculino e de 4,6 casos/100.000 habitantes para o gênero feminino. No período de 1969 a 1998, a tendência dos coeficientes padronizados de mortalidade permaneceu estável (Ministério da Saúde 2001).

A sobrevida geral em cinco anos dos doentes com CaPa é de menos de 2%. Cerca de 8% dos pacientes sobrevivem quatro anos e 50% sobrevivem três ou mais meses após o diagnóstico (Crocetti, Capocaccia et al. 2004; Imamura e Sobue 2004; Michaud 2004).

A sobrevida média dos pacientes que são submetidos à ressecção pancreática com doença não metastática é de 11 a 20 meses, sendo a sobrevida de 5 anos em torno de 5 a 10% (Richter, Niedergethmann et al. 2003; Ghaneh e Neoptolemos 2004). A sobrevida dos pacientes não submetidos à ressecção sem doença metastática é de 6 a 11 meses; para aqueles com doença metastática, de 2 a 6 meses (Kayahara, Nagakawa et al. 1993; Amikura, Kobari et al. 1995; Delcore, Rodriguez et al. 1996). Portanto há aumento na expectativa de vida dos pacientes após a ressecção cirúrgica.

Os fatores prognósticos com implicação favorável na sobrevida dos pacientes submetidos à ressecção pancreática por adenocarcinoma são: margem livre de doença neoplásica, ausência de acometimento linfonodal, tumores bem ou moderadamente diferenciados, diâmetro tumoral < 2 cm, ausência de invasão perineural e ausência de invasão vascular macroscópica (Trede, Schwall et al. 1990; Cameron, Crist et al. 1991; Conlon, Klimstra et al. 1996; Neoptolemos, Russell et al. 1997; Yeo 1998; Sohn, Yeo et al. 2000; Connor, Bosonnet et al. 2004; Schmidt, Powell et al. 2004). No Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de 1990 a 2006, foram estudados 65 pacientes portadores de adenocarcinoma do pâncreas submetidos à ressecção cirúrgica; os fatores que apresentaram correlação favorável com a sobrevida foram: gênero feminino, não acometimento da margem de ressecção pancreática, não ressecção da veia porta, tumores bem diferenciados, ausência de invasão perineural e estadió clínico (Perini, Montagnini et al. 2008).

Apesar do aprimoramento das técnicas operatórias com melhora nos resultados imediatos, o prognóstico a longo prazo ainda é decepcionante. Contribuem para este quadro desalentador o comportamento biológico do adenocarcinoma de pâncreas, cujos mecanismos celulares de crescimento, invasão e metastatização desempenham papel relevante.

O completo mecanismo pelo qual o adenocarcinoma pancreático desenvolve metástases ainda é desconhecido; porém, de forma geral, seis processos celulares estão associados às características de malignidade e capacidade de invasão e metastatização dos tumores: autossuficiência em sinais de crescimento, não resposta aos sinais inibitórios de crescimento, escape da morte celular programada (apoptose), potencial invasivo, angiogênese contínua e invasão tecidual (Hanahan e Weinberg 2000; Hanahan, Lanzavecchia et al. 2003).

O adenocarcinoma pancreático, como os outros tumores, resulta do acúmulo de mutações adquiridas nos genes, tanto nos oncogenes, como nos genes supressores de tumores e proto-oncogenes. As mutações podem acontecer durante a vida do indivíduo, levando a tumorigênese, e não serem passadas aos seus descendentes, caracterizando a mutação somática.

Inúmeros estudos na literatura médica identificam e analisam a expressão de diversos genes alterados no adenocarcinoma pancreático. Entretanto sua utilidade clínica e as implicações biológicas no comportamento tumoral não são compreendidas completamente. Sua natureza agressiva tem sido relacionada às mutações e inativações dos oncogenes e dos genes supressores de tumor, bem como à expressão anormal de proteínas e receptores envolvidos no crescimento tumoral, em sua diferenciação e em sua capacidade de metastatização (Li, Xie et al. 2004).

Recentemente, o estudo molecular das alterações que ocorrem nos indivíduos com câncer tem demonstrado que as células neoplásicas produzem e expressam em sua membrana ou citoplasma fatores relacionados à agressividade tumoral. Estes fatores apresentam implicações prognósticas importantes, uma vez que podem estratificar os indivíduos em relação ao risco de morte pela doença. Mais do que isto: podem eventualmente direcionar tratamento quimioterápico específico, como o uso de bloqueadores hormonais ou

anticorpos monoclonais. Isto está claramente demonstrado nos pacientes portadores de carcinoma mamário, onde a expressão de receptores de estrógeno e progesterona e a expressão de fatores de crescimento têm sido estudadas. Nestes indivíduos, a sobrevida dos pacientes, cujos tumores não expressam receptores hormonais, é menor do que a daqueles que os expressam. A sobrevida do grupo de pacientes, cujas células neoplásicas expressam o fator de crescimento epitelial (HER2), é pior em relação à dos pacientes cujos tumores não o expressam (Gusterson, Gelber et al. 1992; Grann, Troxel et al. 2005).

No carcinoma mamário, sabe-se que, em relação à expressão hormonal nas células tumorais, pode haver diferença, quando o tecido tumoral é comparado ao tecido metastático linfonodal, em cerca de 20% das vezes (Kuukasjarvi, Kononen et al. 1996). Eis o porquê da necessidade de estudo da expressão dos receptores hormonais no tumor primário e no tecido linfonodal metastático, quando se trata o câncer de mama. Isto também tem sido observado quanto à expressão do fator de crescimento epitelial (HER2/neu), onde se observou conversão da expressão negativa deste marcador para a expressão positiva na recorrência tumoral (Gancberg, Di Leo et al. 2002; Gong, Booser et al. 2005; Zidan, Dashkovsky et al. 2005). Alguns autores sugerem que, ao invés de biópsias seriadas do tecido metastático, se empregue cintilografia marcada com anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumab) a fim de detectar a expressão de HER2/neu (Harris,

Liotcheva et al. 2001; Perik, Lub-De Hooge et al. 2006). Isto, portanto, pode ser utilizado para guiar a terapêutica adjuvante.

Este conhecimento ainda não pode ser utilizado no tratamento do câncer do pâncreas. Na literatura médica, poucos são os estudos que avaliam a expressão dos fatores de crescimento no tecido tumoral e no tecido metastático (Zhang e Yuan 2002; Tobita, Kijima et al. 2003).

Recentemente, um estudo fase III, multicêntrico avaliou a sobrevida dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento com inibidor da tirosinaquinase (erlotinib). Sua associação à gemcitabina aumentou significativamente a sobrevida dos pacientes (Moore, Goldstein et al. 2007). Como no câncer de mama, não haveria uma subpopulação de pacientes com adenocarcinoma pancreático que, talvez, se beneficiasse ainda mais da utilização destes inibidores da tirosinaquinase (ou de anticorpos monoclonais), como, por exemplo aqueles pacientes em cujos tumores houvesse superexpressão do fator de crescimento epitelial?

Sabe-se que o adenocarcinoma pancreático expressa fatores de crescimento e seus receptores, como a família do fator de crescimento epitelial (EGF), seus receptores (EGFR), fatores de crescimento endotelial, fatores de crescimento de fibroblastos e citocinas, como a interleucina 1, 6, 8, o TGFbeta, e o fator de necrose tumoral. (Yamanaka, Friess et al. 1993; Kleeff, Friess et al. 2000; Korc 2007). A

superexpressão de fatores de crescimento e o distúrbio na produção de fatores de inibição de crescimento contribuem para a perda da morte celular programada, a angiogênese e a capacidade de metastatizar (Li, Xie et al. 2004; Luttges, Hahn et al. 2004; Korc 2007).

Outro fato comumente discutido na literatura é o de que nem todas as células tumorais são idênticas, porquanto, ao longo da fase de progressão neoplásica, algumas células adquirem fenótipo mais agressivo, invadindo tecidos adjacentes e originando metástases. Com este intuito, células do tumor primário foram comparadas a células tumorais metastáticas, sendo observado que as células metastáticas frequentemente expressam perfil molecular diferente. Algumas destas moléculas têm sido identificadas como possíveis marcadores de progressão e maior agressividade tumoral (Heppner, 1993).

Nesta linha de investigação, destaca-se o fator de crescimento epitelial (EGF – epidermal growth factor) e seus receptores (EGFR, HER2, HER3 e HER4). Esta classe de moléculas tem sido amplamente estudada, principalmente no carcinoma mamário, onde se verificou que sua maior expressão está correlacionada a maior agressividade tumoral e menor sobrevida (Gancberg, Di Leo et al. 2002; Gong, Booser et al. 2005; Zidan, Dashkovsky et al. 2005).

O receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) pertence a uma família de quatro proteínas relacionadas (EGFR, CerbB-1 ou HER1, CerbB-2 ou HER2, CerbB-3 ou HER3 e CerbB-4 ou HER4). A

denominação Cerb é utilizada em alguns trabalhos e se deve a semelhança que estas proteínas apresentam com o produto gênico da eritroblastose fetal (erbB). O gene EGFR está localizado no braço longo do cromossomo 7 (Coussens, Yang-Feng et al. 1985; Schechter, Hung et al. 1985). Codifica uma glicoproteína de membrana plasmática de 170 kDa, composta de um domínio extracelular, um segmento lipofílico transmembrana, e um domínio intracelular com atividade tirosinaquinase. Todos os membros da família possuem um domínio extra-celular, onde se encontram 13 polipeptídeos como sítio de ligação para a molécula sinalizadora, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático com atividade da tirosinaquinase. O domínio extracelular se pode apresentar sob a conformação inibida ou sob a conformação ativa (Figura 1) (Moasser 2007; Sergina and Moasser 2007).

Figura 1: Receptores da família do EGF (EGFR ou HER1, HER2, HER3, HER4) apresentando sítio de ligação extracelular, porção transmembrana e domínio da tirosinaquinase intracelular. Adaptado de Ciardello, F; Tortora, G. NEJM 358(11) pg 1160-1174, 2008.

Após a ligação do ligante, o receptor forma um dímero que sinaliza para dentro da célula através de sua autofosforilação por intermédio de sua atividade da tirosinaquinase (Figura 2) (Ciardiello e Tortora 2008). Os ligantes da família ErbB podem ser divididos em três grupos (Figura 2). Primeiro grupo inclui o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de transformação do crescimento (TGF-alfa) e a ampirregulina que se ligam ao EGFR ou HER1. O segundo grupo inclui a betacelulina, o ligante da heparina-EGD e a epirregulina, que se ligam ao EGFR e ao HER4. O terceiro grupo é composto por

neurregulinas; as neurregulinas 1 e 2 se ligam ao HER3 e ao HER4 e as neurregulinas 3 e 4 se ligam somente ao HER4 (Ciardiello, Troiani et al. 2006). O HER2 é o único receptor que possui conformação de domínio extracelular fixa e que remete à forma ativa, mesmo na ausência de um ligante (Kim, Khuri et al. 2001; Ciardiello, Troiani et al. 2006).

Figura 2: Mecanismo de ação dos receptores de crescimento epitelial e suas respectivas vias de sinalização intracelular. Legenda bFGF- fator de crescimento básico do fibroblasto, EGF – fator de crescimento epitelial, EGFR – receptor do fator de crescimento epitelial, HB-EGFR- fator de crescimento epitelial ligador de heparina, MAPK-proteína quinase ativadora de mitose, P-fósforo, PI3K- fosfatidil inositol 3,4,5 quinase, SOS – fator ativador do RAS, RAF – serina quinase citoplasmática ativada pelo RAS, TGFα- fator de transformação de crescimento alfa ,VEGF – fator de crescimento endotelial. Adaptado de Ciardello, F; Tortora, G. NEJM 358(11) 1160-1174, 2008.

A tirosinaquinase é enzima que catalisa a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas, com ATP (*adenosine triphosphate*) ou outros nucleotídeos como doadores de fosfato. As proteínas tirosina

quinases são uma grande família multigênica, com particular relevância nas doenças humanas como o câncer. Foram identificados no genoma humano 90 genes tirosinaquinase, entre os quais 58 de tipo receptor (Robinson, Wu et al. 2000). Este tipo de receptor de genes está distribuído em 20 subfamílias, entre as quais está a família HER ou EGFR (Kim, Khuri et al. 2001). A autofosforilação ativa uma série de mecanismos intracelulares que resultam na proliferação celular: bloqueiam a apoptose, ativam a invasão celular e a metastatização, e estimulam a neoangiogênese tumoral (Figura 2).

Resumidamente, como podemos observar na figura 2, após o acoplamento do ligante ao receptor de membrana (EGFR, HER2, HER3, HER4) que ocorre no exterior celular, há formação de homodímeros ou heterodímeros que levarão à fosforilação do domínio dependente de ATP, localizados no interior da célula. Esta fosforilação irá desencadear processo de sinalização intracelular, que ocorrerá no citoplasma extra e intranuclear por dois mecanismos principais: 1- mecanismo RAS-RAF-MEK-MAPK, que controlará a transcrição genética, a progressão do ciclo celular da fase G1 para S e a proliferação celular; 2 – mecanismo PI3K-Akt, que, por sua vez, irá ativar a cascata antiapoptótica.

Células tumorais que apresentam amplificação gênica ou expressão aumentada de EGFR e HER-2 são mais propensas a dar metástases e a invadir tecidos vizinhos, como demonstraram Tobita et

al. e Dugan et al. (Dugan, Dergham et al. 1997; Tobita, Kijima et al. 2003).

A expressão de EGFR nos tumores do trato digestivo também tem sido estudada nos últimos anos (Zhang, Park et al. 2005; Galizia, Lieto et al. 2006; Galizia, Lieto et al. 2007; Wang, Wu et al. 2007; Carneiro, Oliveira et al. 2008; Sirak, Petera et al. 2008;; Kaufman, Mehrotra et al. 2008; Press, Zhang et al. 2008).

Nos tumores de esôfago e junção gastroesofágica, a expressão do EGFR está relacionada à presença de tumores indiferenciados, à recorrência da doença e a menor sobrevida (Yacoub, Goldman et al. 1997; Wilkinson, Black et al. 2004). No adenocarcinoma gástrico, sua expressão tem sido associada a menor sobrevida e utilizada para guiar a terapia alvo (Galizia, Lieto et al. 2007; Carneiro, Oliveira et al. 2008; Sirak, Petera et al. 2008). No adenocarcinoma colorretal, Galizia et al. (2006) encontraram positividade na expressão em 35,5% dos casos; a expressão foi fator independente para recidiva da doença e sobrevida (Galizia, Lieto et al. 2006). Steele et al (1990) também observaram pior sobrevida na expressão do EGFR (Steele, Kelly et al. 1990).

No adenocarcinoma pancreático, a superexpressão do EGFR é relatada em cerca de 30-60% dos tumores (Yamanaka, Friess et al. 1993; Friess, Guo et al. 1999; Dancer, Takei et al. 2007). Entretanto, Velte et al. (2009) não encontraram superexpressão deste marcador em 45 tumores avaliados (Te Velde, Franke et al. 2009). Na literatura,

portanto, não existe consenso sobre a expressão do EGFR neste tipo de tumor. A expressão do EGFR no câncer do pâncreas tem sido relacionada ao estadio da doença e à presença de metástases (Yamanaka, Friess et al. 1993; Friess, Guo et al. 1999; Zhang e Yuan 2002; Dancer, Takei et al. 2007).

Yamanaka e al. (1993) encontraram associação entre a expressão do EGFR e o tamanho tumoral, estadio clínico mais avançado e menor sobrevida (Yamanaka, Friess et al. 1993). Tobita et al. (2003) observaram relação positiva entre a superexpressão do EGFR e as seguintes variáveis: gênero, diferenciação tumoral e estadio clínico (Tobita, Kijima et al. 2003).

O EGFR, portanto, torna-se foco de especial atenção, uma vez que o uso de drogas capazes de se ligarem ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epitelial, ou de drogas capazes de adentrarem o citoplasma celular e inibirem a ativação dos domínios da tirosinaquinase dos homodímeros ou heterodímeros dos fatores de crescimento epiteliais implica novas perspectivas ao tratamento das neoplasias sólidas. Isto tem sido observado no adenocarcinoma pulmonar e no adenocarcinoma pancreático (Zhang, Wang et al. 2000; Kim 2004; Juergens e Brahmer 2007).

Os anticorpos monoclonais capazes de se ligarem ao domínio extracelular dos fatores de crescimento, como o cetuximabe (Erbix®) e o panitumumab (Vectibix®), se fixam no domínio extracelular e com

isto impedem a formação de homodímeros ou heterodímeros, bloqueando a ativação do domínio da tirosinaquinase intracelular (Figura 3).

As drogas inibidoras da tirosinaquinase, por sua vez, adentram o citoplasma celular e competem com o ATP pelo domínio catalítico, impedindo a auto-fosforilação e a sinalização intra-celular. Dentre estas drogas, temos o erlotinib (Tarceva®) e o gefitinib (Iressa®).

Figura 3: Mecanismo de ação do anticorpo monoclonal antiEGFR e dos inibidores da tirosinaquinase (EGFR-TKIs). Adaptado de Ciardello, F; Tortora, G. NEJM 358(11) pg 1160-1174, 2008.

Independentemente do bloqueio (extracelular, por meio de anticorpos monoclonais ou intracelular, por meio de pequenas moléculas) ocorre a inibição da proliferação celular, da neoangiogênese tumoral e da produção de fatores estimuladores do crescimento tumoral e da metastatização. Ocorre também inibição da invasão celular, potenciação do efeito antitumoral das drogas citotóxicas e da radioterapia (Ciardiello 2005).

O anticorpo monoclonal contra o EGFR, cetuximabe, por ser uma imunoglobulina G1, pode ativar resposta imune antitumoral, incluindo a citotoxicidade mediada por células e a citotoxicidade anticorpo dependente (Figura 4). Além disto, podem levar à internalização e regulação retrógrada, ocasionando a degradação dos receptores celulares.

Figura 4: Mecanismo de ativação da citotoxicidade mediada por células (A) e por anticorpos (B). Adaptado de Ciardello, F; Tortora, G. NEJM 358(11) 1160-1174, 2008.

O recente avanço no uso da terapia alvo (anticorpos monoclonais e inibidores da tirosinaquinase) abre novas perspectivas no tratamento do câncer. No adenocarcinoma pancreático, até o presente momento, os dados não foram muito significantes (Van Cutsem, Aerts et al. 2004; Javle, Yu et al. 2009; Kullmann, Hollerbach et al. 2009). Tais trabalhos não encontraram melhora da sobrevida nos pacientes portadores de câncer do pâncreas. Até o momento apenas a adição do erlotinib à gemcitabina aumentou a sobrevida dos pacientes com câncer do pâncreas (Moore, Goldstein et al. 2007).

Assim, permanece aberta a questão do real papel do EGFR no adenocarcinoma pancreático em relação à sobrevida e à sua aplicabilidade clínica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar a expressão imuno-histoquímica do receptor de crescimento epitelial (EGFR) no tecido tumoral, no tecido não tumoral e no tecido metastático linfonodal de pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.

2.2 Correlacionar a expressão tumoral deste marcador com os dados clinicopatológicos, estadiamento da doença e sobrevida dos pacientes.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

Sessenta e seis pacientes, portadores de adenocarcinoma pancreático, submetidos à ressecção pancreática com intuito curativo no Serviço de Cirurgia de Vias Biliares e Pâncreas da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1990 a 2006, e 22 pacientes operados no Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1998 a 2006, foram avaliados retrospectivamente, a partir de um banco de dados clínicos e patológicos, criado entre os dois Hospitais (Perini 2005; Diniz 2008).

Este estudo colaborativo entre estas duas Instituições foi aprovado nas respectivas comissões de ética, com a finalidade de obter-se maior número de pacientes operados seguindo o mesmo protocolo cirúrgico (Projeto 1096 /08 Hospital A.C. Camargo e Projeto de Pesquisa CAPPesq 0193/07 HCFMUSP – Apêndices 1 e 2).

O banco de dados incluiu somente pacientes submetidos à ressecção cirúrgica R0 e R1 e que não apresentavam doença metastática. Os dados foram obtidos nos prontuários de internação de cada paciente e registrados em formulário específico e transcritos para o banco de dados eletrônico (Apêndice 3).

3.1 Dados demográficos

Os dados demográficos analisados foram: gênero, idade e etnia. Para a análise da sobrevida em relação à idade, os pacientes foram divididos em dois grupos (> 75 anos e < 75 anos) (Scurtu, Bachellier et al. 2006).

3.2 Patologia clínica

Foram coletados e analisados os seguintes dados de patologia clínica: marcadores tumorais CA 19-9 e antígeno carcinoembrionário (CEA). Os valores de patologia clínica utilizados não excediam trinta dias anteriormente ao procedimento cirúrgico, havendo preferência pelos exames coletados próximos ao dia da cirurgia. O nível de corte para categorização do antígeno carcinoembrionário (CEA) e do CA 19-9 em normal e elevado foi de 5 ng/ml e 200UI/ml, respectivamente (Ritts 1998).

3.3 Tratamento cirúrgico e ressecção da veia porta

As cirurgias foram classificadas como: gastroduodenopancreatectomia, duodenopancreatectomia com preservação do piloro, pancreatectomia corporocaudal e gastroduodenopancreatectomia total. Foi considerada ressecção da veia porta, quando houve remoção cirúrgica da veia porta por suspeita de invasão tumoral, quer tenha sido tangencial quer segmentar.

3.4 Anatomia patológica

Os blocos de parafina, que continham fragmentos dos tecidos tumorais, pancreático não tumoral e metastático linfonodal de pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático, foram pesquisados no Departamento de Patologia do HCFMUSP e revistos (Dra Rosely Patzina - RP) e enviados ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, onde foram reavaliados, armazenados e analisados (Dra Renata Coudry - RC), juntamente com os blocos pesquisados no Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo. Todas as reações de imuno-histoquímicas foram realizadas no Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo. Ambos os patologistas desconheciam a procedência das peças.

A classificação histopatológica utilizada foi a da Organização Mundial da Saúde: 2000 (Kloppel 2000). O diagnóstico de adenocarcinoma foi confirmado pela revisão sistemática de todas as peças cirúrgicas. Os tumores foram classificados de acordo com sua diferenciação celular, conforme o Quadro 1 (Kloppel, Lingenthal et al. 1985).

O tamanho do tumor foi determinado em centímetros e obtido do laudo do exame patológico macroscópico.

Os linfonodos que, no exame microscópico, revelaram metástases tumorais foram designados como acometidos (N1) e os

sem doença neoplásica como sem acometimento (N0) (Sobin KL 2002).

Quadro 1 - Graduação histopatológica do adenocarcinoma pancreático

Grau tumoral	Diferenciação glandular	Produção de mucina	Número de Mitoses por campo	Características nucleares
Grau I	Bem diferenciado	Intensa	<5	Pouco polimorfismo, arranjo polar
Grau II	Moderadamente diferenciado	Irregular	6-10	Polimorfismo moderado
Grau III	Pouco diferenciado	Ausente	>10	Polimorfismo acentuado e tamanho aumentado

Invasão vascular e invasão neural foram verificadas, quando havia células tumorais nos microvasos e ao redor dos nervos, junto ao tumor. Invasão da veia porta foi confirmada, quando, no exame anatomopatológico, identificou-se infiltração de seus planos por células tumorais. A margem de ressecção foi considerada comprometida (positiva), quando foram encontradas células tumorais, nas margens pancreáticas ou coledociana. Ressecção R0 foi considerada, quando não havia tumor microscópico residual nas margens da ressecção;

ressecção R1 foi considerada, quando havia tumor microscópico residual; e ressecção R2, quando havia tumor residual macroscópico.

Todos os pacientes foram classificados de acordo com a UICC após a revisão sistemática das peças cirúrgicas pelos patologistas (Quadro 2 e 3) (Sobin KL 2002).

Quadro 2 - Classificação da União Internacional contra o Câncer em relação tamanho tumoral, acometimento linfonodal e metástase a distância

Tumor primário	
T0	Sem evidências do tumor primário.
Tx	Tumor primário não pode ser localizado.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor de 2 cm ou menos.
T2	Tumor com mais de 2 cm limitado ao pâncreas.
T3	Tumor se estende além do pâncreas, mas não envolve tronco celíaco ou artéria mesentérica superior.
T4	Tumor se estende além do pâncreas e envolve tronco celíaco ou artéria mesentérica superior.
Linfonodos regionais (N)	
Nx	Acometimento linfonodal não avaliável.
N0	Acometimento linfonodal ausente.
N1	Acometimento linfonodal presente.
Metástase a distância (M)	
Mx	Metástase à distância não avaliável.
M0	Metástase à distância ausente.
M1	Metástase à distância presente.

Quadro 3 - Estadiamento do adenocarcinoma pancreático preconizado pela União Internacional contra o Câncer (UICC)

Estadio	Tumor	Linfonodo	Metástase
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
III	T4	qualquer N	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1

Para efeito de análise, os estádios clinicopatológicos foram agrupas em I (Ia e Ib), II (IIa e IIb) e III.

3.5 Análise imuno-histoquímica

3.5.1 Tissue micro array (TMA)

Estudos anteriores de nosso grupo (Perini 2005; Diniz 2008) permitiram a criação de um banco de dados clínicos e patológicos, utilizado neste estudo. Dos 88 pacientes operados, somente foi possível a obtenção de material histopatológico para realização do TMA em 62 casos.

Foram utilizados dois blocos de TMA (Beecher Instruments, Silver Springs, USA); cada bloco continha amostras do tecido

pancreático não tumoral, tecido tumoral e tecido metastático linfonodal obtidas de duas áreas diferentes da mesma amostra e dispostas em duplicata. Cada bloco de TMA era composto de 113 *cores* de 1mm, sendo o primeiro *core* representado por fragmento de fígado normal, utilizado como referência. Com os blocos de TMA prontos, foram obtidos cortes de 3 µm de espessura, colhidos em lâminas com adesivos especiais para a técnica (Instrumedics Inc.). O TMA foi construído com utilização do Manual Tissue Arrayer I, aparelho fabricado e adquirido pela Beecher Instruments Inc.

3.5.2 Receptor do fator de crescimento epitelial

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo. As regiões a serem amostradas para a confecção do bloco de TMA foram selecionadas por um patologista (RC), que orientou a confecção do bloco final de TMA. Duas lâminas de cada bloco de TMA, com cortes em dois níveis e com 40 cortes de diferença entre elas, foram submetidas às reações de imuno-histoquímica. Os cortes no bloco foram realizados com micrótomo manual e transferidos em fita adesiva para as lâminas adesivas especiais (Instrumentic Inc. Hackensack, NJ, USA).

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pela técnica de polímero sem biotina (Advance), utilizando-se o anticorpo primário:

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor – NCL-EGFR mouse monoclonal antibody, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK). Os passos técnicos realizados resumidamente são os seguintes (Alves 1999):

- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3

banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente.

- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 a 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi). Lavagem em água corrente por 5 minutos; (obs. Verificar qual método de recuperação foi utilizado).

- Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes.

- Lavagem em PBS.

- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO).

- Incubação do anticorpo primário por 2 horas em temperatura ambiente (Ta) em câmara úmida.

- Lavagem em PBS.

- Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link -DAKO) por 30 minutos.

- Lavagem em PBS.

- Incubação com Polímero (Advance HRP enzyme- DAKO) por 30 minutos.
- Lavagem em PBS.
- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California).
- Lavagem em água corrente.
- Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos.
- Lavagem em água corrente por 5 minutos.
- Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente.

Os resultados da análise da expressão imuno-histoquímica citoplasmática do EGFR foi baseada na intensidade da marcação das células tumorais, divididas em quatro categorias (Kountourakis, Pavlakis et al. 2006):

- 0 - nenhuma marcação ou marcação fraca em menos de 10% das células tumorais.
- 1+ - marcação com intensidade fraca, em parte de seu citoplasma, em mais de 10% das células.
- 2+ - marcação completa do citoplasma de intensidade fraca a moderada em mais de 10% das células.
- 3+ - marcação de intensidade forte em mais de 10% .

Para efeito de análise da marcação em membrana, o resultado desta expressão foi mensurado de acordo com as regras do teste

reconhecido pela Food and Drug Administration para o estudo do HER2, demonstrado no quadro 4(FDA)(Hanna, O'Malley F et al. 2007; Wolff, Hammond et al. 2007):

Quadro 4 - Classificação da expressão do HER2.

Escore	Expressão do HER2	Padrão de Coloração
0	Negativa	Nenhuma coloração é observada nas células neoplásicas invasivas.
1+	Negativa	Coloração fraca e incompleta da membrana em qualquer proporção de células neoplásicas invasivas ou coloração fraca e completa em menos de 10% das células neoplásicas invasivas.
2+	Equívoco	Coloração de membrana completa, não uniforme; ou coloração fraca, mas com óbvia distribuição circunferencial em no mínimo 10% das células; ou intensa e completa em 30% ou menos das células.
3+	Positiva	Coloração forte e completa da membrana, observada em mais de 30% das células tumorais.

Após a exclusão das amostras sem tumor, os valores de cada uma das amostras do TMA foram somados e o resultado então dividido

pelo número de amostras de tumor estudadas. Obteve-se uma média de intensidade das amostras imuno-histoquímicas. As amostras de tumores que tiveram os valores da média compreendidos entre 0 e 0,25 foram consideradas como reação “negativa”; valores entre 0,26 e 1,4 foram considerados como “fraca intensidade”; valores entre 1,5 e 2,4 foram considerados como “moderada intensidade” e de 2,5 a 3 considerados como “forte intensidade”.

Então os tumores com média de expressão considerada negativa ou fraca (média entre 0 e 1,4), foram categorizados como “expressão negativa”; aqueles com média de expressão “moderada intensidade” e “forte intensidade”, (média entre 1,5 e 3), foram categorizados como “expressão positiva” (Figuras 5 a 7).

Figura 5: Fotomicrografia de epitélio ductal normal do pâncreas (40x)

Figura 6: Fotomicrografia de adenocarcinoma de pâncreas, exibindo expressão positiva para EGFR na membrana e no citoplasma (40x)

Figura 7: Fotomicrografia de tecido metastático linfonodal de adenocarcinoma de pâncreas, exibindo expressão positiva para EGFR na membrana e no citoplasma (40x)

3.6 Sobrevida

Os pacientes foram classificados em vivos, mortos pela doença, mortos por outras causas e perda de seguimento. Perda de seguimento foi definida como a ausência de retorno ambulatorial por período superior ao dobro do agendado. A sobrevida foi calculada em meses, a partir da data da cirurgia.

3.7 Análise estatística

A análise descritiva da amostra foi realizada por meio de tabelas de contingência para as variáveis categóricas. Para as variáveis numéricas, a média, a mediana, o desvio padrão e o intervalo de confiança foram calculados.

Foi utilizado o teste T de Student ou ANOVA, com significância de 5%, para comparar as médias das variáveis numéricas. O teste de qui-quadrado e exato de Fischer foi utilizado para medir associação nas tabelas de contingência.

Os diferentes grupos (duodenopancreatectomia e gastroduodenopancreatectomia) foram analisados e comparados quanto à sua homogeneidade.

As curvas de sobrevida foram calculadas usando Kaplan-Meier; o teste de log-rank foi utilizado para avaliar a diferença entre as curvas de sobrevida. O nível de significância adotado foi de 5%.

As variáveis cujo nível de significância foi menor que 10% no teste de log-rank, associado à curva de Kaplan-Meier, foram estudadas no modelo de regressão logística de Cox; foram consideradas significantes as variáveis que, neste estudo, apresentaram $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 - Dados demográficos

Quarenta e um (46,6%) pacientes eram do gênero masculino e 47 (53,4%) eram do gênero feminino. A idade média geral foi de 59,1 anos (desvio padrão: 11,14), variando de 28 a 87 anos (Tabela 1). A maioria dos pacientes era da raça branca (75%), seguida da negra (15,9%) e amarela (9,1%).

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica segundo gênero, idade e raça.

Variável		N	%
Gênero	Masculino	41	46,6
	Feminino	47	53,4
Idade (anos)	Média	59,1	
	Variância	28-87	
Raça	Amarela	8	9,1
	Negra	14	15,9
	Branca	66	75

4.2 - Patologia clínica

Dos 88 pacientes estudados, somente 49 apresentam dosagem de CEA e 54 de CA 19-9. Os valores medianos encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos resultados de patologia clínica de pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.

Variável	n (%)	Total
CA 19-9 (>200UI/ml)*		54
Não	31 (57,4%)	
Sim	23 (42,6%)	
Mediana	115	
CEA > 5mcg/ml*		49
Não	31(63,3%)	
Sim	18(36,7%)	
Mediana	3,0	

* dados não disponíveis em alguns pacientes

A dosagem média de CA 19-9 foi de 10.182UI/ml (dp=67.365) com mediana de 155,7UI/ml. A dosagem média de CEA foi de 5,7mcg/ml (dp =7,5) e mediana de 3,0mcg/ml.

4.3 – Tratamento cirúrgico e ressecção da veia porta

Dos 88 pacientes, 49 (55,6%) foram submetidos à duodenopancreatectomia com preservação do piloro, 31 (35,2%); à gastroduodenopancreatectomia, seis (6,8%); à pancreatectomia corporocaudal; dois (2,3%) à gastroduodenopancreatectomia total (Tabela 3).

A ressecção da veia porta foi necessária em 12 (13,6%) pacientes; a confirmação histológica de invasão da veia porta por tecido tumoral foi possível em dois dos doze casos (16,6%)(Tabela 3).

Tabela 3 - Tipo de ressecção pancreática realizadas em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático e sua distribuição em relação à ressecção da veia porta.

Tipo de Ressecção	DPT	GDP	PCC	PT	Total
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Ressecção veia porta					
Não	44(89,8)	26(83,8)	6(100)	0	76(86,5)
Sim	5(10,2)	5(16,1)	0	2(100)	12 (13,5)
Total	49 (55,6)	31(35,2)	6(6,8)	2(2,3)	88(100)

Legenda: DPT=duodenopancreatectomia,
GDP=gastroduodenopancreatectomia, PPC=pancreatectomia
corporocaudal, PT=gastroduodenopancreatectomia total

4.4 - Anatomia patológica

O tamanho médio dos tumores foi de 3,75cm. Cinquenta e dois pacientes (59,1%) apresentavam tumores moderadamente diferenciados; 28 (31,8%) tumores bem diferenciados; e oito (9,1%), tumores pouco diferenciados (Tabela 4). Na tabela 5, observa-se a distribuição da diferenciação tumoral em relação ao tamanho, acometimento linfonodal e estágio clínico.

Tabela 4 – Grau de diferenciação tumoral dos adenocarcinomas ductais em pacientes submetidos à ressecção cirúrgica.

Adenocarcinoma	N	%
Bem diferenciado	28	31,8
Moderadamente diferenciado	52	59,1
Pouco diferenciado	8	9,1
Total	88	100

Invasão vascular foi observada em 27 (31%) pacientes; a invasão neural em 77 (88,5%)(Tabela 6).

Trinta e três (37,5%) pacientes apresentavam células neoplásicas nas margens de ressecção (pancreática, coledociana ou retroperitoneal), caracterizando ressecção R1 (Tabela 6).

Tabela 5 - Distribuição da diferenciação tumoral em relação ao tamanho, acometimento linfonodal e estadio clínico em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.

Grau de Diferenciação	Bem	Moderado	Pouco	Total	p
	n (%)	N (%)	n (%)	n (%)	
Tamanho					0,28
Médio (cm)	3,4	3,9	3,7	3,75	
<2cm	4(14,3)	13(24,5)	0	17(19,3)	
>2cm	24(85,7)	39(75)	8 (100)	71(80,7)	
Acomet. linfonodal					0,95
Não	13(46,4)	24(46,1)	4(50)	42(47,1)	
Sim	15(53,6)	28(53,8)	4(50)	46(52,9)	
Estadio Clínico					0,81
1 A	3(10,7)	2(3,8)	0	5(5,7)	
1 B	5(17,9)	9(17,3)	1(12,5)	15(17)	
2 A	5(17,9)	11(21,2)	3(37,5)	19(21,6)	
2 B	14(50)	29(55,8)	4(50)	47(53,4)	
3	1(3,6)	1(1,9)	0	2(2,3)	
Total	28 (31,8)	52 (59,1)	8 (9,1)	88(100)	

Tabela 6 - Distribuição da diferenciação tumoral em relação às variáveis patológicas dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.

Grau de Diferenciação	Bem	Moderado	Pouco	Total	p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Ressecção da veia porta					0,24
Não	23(82,1)	47(90,4)	6(75)	76(86,5)	
Sim	5(17,9)	5(9,4)	2(25)	12(13,5)	
Invasão da veia porta					0,18
Não	5(17,9)	3(5,7)	2(25)	10(11,2)	
Sim	0	2(3,8)	0	2(2,2)	
Invasão neural					0,82
Não	4(14,3)	5(9,4)	1(12,5)	10(11,5)	
Sim	24(85,7)	46(90,2)	7(87,5)	77(88,5)	
Invasão vascular					0,19
Não	23(82,1)	32(62,7)	5(62,5)	60(69)	
Sim	5(17,9)	19(37,3)	3(37,5)	27(31)	
Margem comprometida					0,81
Não	18(64,3)	32(61,5)	4(50)	54(62,3)	
Sim	10(35,7)	19(36,5)	4(50)	33(37,5)	
Pancreática	6(21,4)	13(25,5)	3(37,5)	22(25,0)	
Coledociana	5(17,9)	2(3,9)	1(12,5)	8(9,1)	
Retroperitoneal	3(10,7)	6(11,5)	2(25)	11(12,5)	
Total	28 (31,8)	52 (59,1)	8 (9,1)	88(100)	

4.5 – Expressão do EGFR na membrana celular

Dos 88 pacientes operados, recuperou-se o tecido tumoral de 62 (70,4%) espécimes, do tecido metastático linfonodal em 21 (45,6%) dos 46 e do tecido pancreático não tumoral em 30 (34%) para estudo imuno-histoquímico(TMA).

As expressões do EGFR na membrana do tecido tumoral e na membrana do metastático linfonodal, quando comparadas à expressão do EGFR na membrana do tecido pancreático não tumoral, foram diferentes ($p=0,004$ e $p=0,02$, respectivamente). A expressão do marcador na membrana do tecido tumoral, quando comparada à expressão no tecido metastático linfonodal, não apresentou diferença estatística ($p=0,28$) (Tabela 7).

Variáveis clínicas, patológicas e cirúrgicas foram comparadas quanto à expressão do EGFR na membrana do tecido não tumoral, tumoral e metastático linfonodal (Tabela 8).

A única variável que apresentou diferença quanto à expressão do EGFR foi o gênero: observou-se que o gênero masculino apresentava maior expressão positiva do marcador, quando comparado ao gênero feminino ($p=0,03$).

Tabela 7- Expressão do EGFR na membrana celular da região tumoral, não tumoral e metastática linfonodal em pacientes operados por adenocarcinoma pancreático.

Tecido	Expressão do EGFR na membrana celular	
	Ausente	Presente
Tumoral	40/62 (64,5%)	22/62 (35,5%)
Metástase linfonodal	16/21 (76,2%)	5/21 (23,8%)
Não tumoral	30/30 (100%)	0

* tecido tumoral *versus* tecido metastático linfonodal (p=0,28)

** tecido tumoral *versus* tecido não tumoral (p=0,004)

*** tecido não tumoral *versus* tecido metastático linfonodal (p=0,02)

Tabela 8- Expressão do EGFR na membrana celular dos tecidos tumoral, não tumoral e metastático linfonodal em relação às diferentes variáveis clinicopatológicas de pacientes operados por adenocarcinoma pancreático.

Expressão do EGFR nos diferentes tecidos	Tumoral	Não tumoral	Metástase linfonodal
Variáveis estudadas	p	p	p
Raça	0,85	0,56	0,36
Gênero	0,03	0,09	0,52
CA 19-9	0,32	0,52	0,41
CEA	0,09	0,56	0,11
Tamanho tumoral (>2cm)	0,20	0,12	0,13
Diferenciação	0,09	0,10	0,12
Acometimento linfonodal	0,09	0,25	0,31
Invasão neural	0,51	0,25	0,24
Invasão linfática	0,25	0,13	0,32
Invasão vascular	0,21	0,23	0,52
Estadio TNM	0,22	0,56	0,85
Margem positiva	0,09	0,10	0,12
Margem pancreática	0,09	0,23	0,25
Margem retroperitoneal	0,17	0,16	0,54
Margem coledociana	0,25	0,23	0,85
Invasão tecido peripancreático	0,11	0,23	0,54

4.6 – Expressão do EGFR no citoplasma celular

Quanto à expressão citoplasmática do EGFR, o tecido tumoral e o metastático linfonodal, quando comparados ao tecido não tumoral, não apresentaram diferença (Tabela 9).

O tecido tumoral, quando comparado ao tecido metastático linfonodal quanto à expressão do EGFR no citoplasma, também não apresentou diferença estatística (Tabela 9).

Tabela 9- Expressão do EGFR no citoplasma celular na região tumoral, não tumoral e metastática linfonodal em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.

Tecido	Expressão do EGFR no citoplasma celular	
	Ausente	Presente
Tumoral	55/62 (88,7%)	7/62 (11,3%)
Metástase linfonodal	20/21 (95,2%)	1/21 (4,8%)
Não tumoral	30/30 (100%)	0

* tecido tumoral *versus* tecido metastático linfonodal (p=0,58)

** tecido tumoral *versus* tecido não tumoral (p=0,91)

*** tecido não tumoral *versus* tecido metastático linfonodal (p=0,89)

As mesmas variáveis clínicas, patológicas e cirúrgicas estudadas, quanto à expressão do EGFR na membrana celular (Tabela 8), foram comparadas quanto à expressão do EGFR no citoplasma

celular nos tecido não tumoral, tumoral e metastático linfonodal. Não foi encontrada associação significativa entre nenhuma delas.

4.7 – Sobrevida

A sobrevida global média foi de 33,5 e a mediana de 22,9 meses (Gráfico 1). A sobrevida cumulativa em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 48%, 20% e 18%, respectivamente.

As sobrevidas por estadio estão apresentadas na tabela 10. Houve menor sobrevida global nos estadios mais avançados, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$).

Tabela 10 - Sobrevida média (em meses) por estadio clínico em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica.

Estadio	N	1 ano	3 anos	5 anos	Global
I	20	11,6	28,0	30,3	46,9
II	66	10,7	21,5	22,2	30,1
III	2	10,5	10,5	5,5	10,5
Total	88	10,9	22,8	23,5	33,5
	<i>p</i>	<i>0,07</i>	<i>0,03</i>	<i>0,004</i>	<i>0,04</i>

Gráfico 1 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica

No gráfico 2, observam-se as curvas de sobrevida em relação ao estadio clínico dos pacientes,

Gráfico 2 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto ao Estadio - TNM

Na tabela 11, observamos as variáveis que apresentaram correlação estatisticamente significativa em relação à sobrevida na análise univariada ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Variáveis clínicas e patológicas que apresentaram correlação com a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma pancreático submetidos à ressecção cirúrgica na análise univariada

Variáveis	Sobrevida média(m)	Sobrevida mediana (m)	p
Gênero			0,03
Masculino	26,1	18,3	
Feminino	38,4	24,8	
Ressecção da veia porta			0,01
Não	36,0	23,5	
Sim	16,6	10,5	
Acometimento linfonodal			0,05
Não	39,7	32,8	
Sim	27,1	18,9	
Invasão neural			0,05
Não	49,2	39,3	
Sim	29,9	19,8	
Invasão vascular			0,05
Não	35,7	25,1	
Sim	23,2	18,1	
Invasão tecido peripancreático			0,05
Não	33,4	24,3	
Sim	17,8	11,7	
Margem cirúrgica comprometida			0,007
Não	36,4	25,1	
Sim	17,9	18,1	
Estadio TNM			0,04
IA e IB	46,9	42,8	
IIA e IIB	30,1	19,3	
III	10,5	10,5	
Expressão do EGFR na membrana do tecido tumoral			0,05
Não	33,9	19,8	
Sim	18,1	11,8	

A tabela 12 mostra as variáveis estudadas que não apresentaram correlação com a sobrevida dos pacientes na análise univariada ($p>0,05$).

Tabela 12 - Variáveis sem correlação com a sobrevida dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático na análise univariada.

Variáveis estudadas	p
Raça	0,14
Idade (75anos)	0,55
CEA	0,07
CA 19-9	0,17
Tipo de ressecção	0,54
Tamanho tumoral (2cm)	0,37
Expressão EGFR de membrana na metástase linfonodal	0,10
Expressão EGFR do citoplasma no tecido tumoral	0,16
Expressão EGFR do citoplasma na metástase linfonodal	0,55

Os gráficos referentes às curvas de sobrevida cumulativa relacionadas aos parâmetros que apresentaram diferença na análise univariada, em relação aos meses de pós-operatório, encontram-se nos apêndices de 4 a 10.

No gráfico 3, observam-se as curvas de sobrevida dos pacientes, quanto à expressão do EGFR na membrana celular do tecido tumoral e o percentual de sobrevida no respectivo período.

Gráfico 3 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a resseccção cirúrgica quanto a expressão do EGFR na membrana celular do tecido tumoral

Número de casos

Expressão negativa	37	25	13	7	4	3	2	2	2
Expressão positiva	21	9	6	1	0	0	0	0	0

Na tabela 13, observa-se o percentual de sobrevida em 1ano, 3 anos, 5 anos e global dos pacientes, quanto à expressão do EGFR. E na tabela 14, a sobrevida média e mediana globais dos pacientes.

Tabela 13 – Sobrevida dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático sobreviventes em 1 ano, 3 anos, 5 anos e global, quanto à expressão de EGFR na membrana do tecido tumoral.

Porcentagem de sobreviventes	1 ano	3 anos	5 anos	Global
Expressão				
Negativa	77%	30%	8%	7%
Positiva	46%	8%	0%	0%
<i>p</i>	0,01	0,01	0,03	0,05

Tabela 14 – Sobrevida média e mediana globais (em meses) dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático, quanto à expressão de membrana do EGFR no tecido tumoral.

Expressão de membrana do EGFR no tecido tumoral	Sobrevida média global (meses)	Sobrevida mediana global (meses)
Negativa	33,9	19,8
Positiva	18,1	11,8
<i>p</i>	0,05	0,05

Na tabela 15, encontram-se as variáveis que apresentaram implicações na sobrevida dos pacientes estudados na análise multivariada (modelo de regressão de Cox).

Tabela 15 - Variáveis clínicas e patológicas que apresentaram correlação com a sobrevida dos pacientes operados por adenocarcinoma pancreático na análise multivariada (Cox).

Variáveis	Risco	IC 95%	P
Gênero (feminino)			0,02
Masculino	2,5	(1,4 – 4,6)	
Ressecção da veia porta (não)			0,03
Sim	2,2	(1,06 – 4,7)	
Invasão neural (não)			0,05
Sim	2,5	0,97-6,7	
Invasão vascular (não)			0,01
Sim	2,07	(1,1 –3,7)	
p=0,01			

4.8 - Variável gênero

Considerando-se que o gênero masculino foi fator de risco independente para pior sobrevida, a variável gênero foi comparada a todas as outras variáveis, em busca de uma possível explicação. Na tabela 16, observa-se a relação entre o gênero e os dados

demográficos e de anatomia clínica. Na tabela 17, tem-se a comparação entre o gênero e as variáveis patológicas.

Tabela 16 – Comparação entre o gênero e as variáveis demográficas e de anatomia clínica (teste exato de Fischer).

Variáveis	Masculino N(%)	Feminino N(%)	P
Raça			0,67
Branca	30 (34,1)	36(40,9)	
Negra	6(6,8)	8(9,1)	
Amarela	5(5,7)	3(3,4)	
Idade			0,12
< 75 anos	38(43,2)	38(43,2)	
> 75 anos	3(3,4)	9(10,2)	
CA 19-9			0,58
<200UI/ml	16(29,1)	15(27,3)	
>200UI/ml	10(18,2)	14(25,5)	
CEA			0,99
<5mcg/ml	14(28,6)	17(34,7)	
>5mcg/ml	8(16,3)	10(20,4)	

Tabela 17 - Comparação entre o gênero e as variáveis anátomo-patológicas (teste exato de Fischer).

Variáveis	Masculino N(%)	Feminino N(%)	P
Tamanho tumoral			0,78
< 2cm	7(8)	10(11,4)	
> 2 cm	34(38,6)	37(42)	
Diferenciação tumoral			0,03
Bem	10(11,4)	18(20,5)	
Moderado	24(27,3)	28(31,4)	
Pouco	7(8)	1(1,1)	
Acometimento linfonodal			0,28
Não	16(18,4)	25(28,7)	
Sim	24(27,6)	22(25,3)	
Invasão neural			0,18
Não	7(8)	3(3,4)	
Sim	34(39,1)	43(49,4)	
Invasão vascular			0,001
Não	36(41,4)	24(27,6)	
Sim	5(5,7)	22(25,3)	
Estadio TNM			0,54
I	7(8)	13(14,8)	
II	33(37,5)	33(37,5)	
III	1(1,1)	1(1,1)	
Margem positiva			0,98
Não	25(28,7)	29(33,3)	
Sim	15(17,2)	18(20,7)	
Invasão tecido peripancreático			0,97
Não	33(38,4)	37(43)	
Sim	7(8,1)	9(10,5)	

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

De todos os tumores do trato gastrointestinal, o câncer do pâncreas está associado à pior sobrevida, uma vez que a maioria dos pacientes morre dentro do primeiro ano após o diagnóstico (Parker, Tong et al. 1996). Embora o tratamento cirúrgico tenha evoluído com morbi-mortalidade aceitáveis, grande parte dos pacientes apresenta recorrência após a ressecção. Os dados aqui apresentados mostram que sobrevida semelhante àquela da literatura médica atual e índice de complicações aceitável são factíveis em centros especializados no tratamento desta patologia (Nitecki, Sarr et al. 1995; Schmidt, Powell et al. 2004; van Heek, Kuhlmann et al. 2005; Cameron, Riall et al. 2006).

O adenocarcinoma pancreático apresenta algumas particularidades em relação à sua gênese e ao seu comportamento. Isto tem sido inferido principalmente pela capacidade que os pequenos tumores apresentam de metastatização, acometimento linfonodal e recidiva locorregional. Se, por um lado, podemos treinar os cirurgiões a realizarem procedimentos seguros e padronizados, por outro lado ainda não conseguimos interferir com o comportamento do tumor, por mais que a gemcitabina adjuvante tenha melhorado a sobrevida destes indivíduos (Neoptolemos, Stocken et al. 2004); portanto o treinamento e a realização adequada de uma ressecção pancreática são fatores prognosticadores quanto à sobrevida.

Entretanto, por mais que o avanço nos cuidados perioperatórios tenha influenciado a melhora na sobrevida dos pacientes com CaPa, o comportamento tumoral desempenha papel decisivo.

A procura por moléculas expressas pelo tumor que possam ser alvo para tratamento quimioterápico tem influenciado o tratamento de diversos tumores do aparelho digestivo. A expressão de fatores de crescimento celular implicados no processo de crescimento tumoral, como o EGFR, foram avaliados no câncer do pâncreas em alguns estudos.

Yamanaka et al. (1993) estudaram a expressão de EGF, EGFR e TGF alfa em 87 pacientes com CaPa. Neste estudo, 43% dos pacientes apresentavam positividade de expressão do EGFR; e a co-expressão do receptor em um de seus ligantes ocorreu em 38% dos casos e esteve associada a tumores maiores, a estadió clínico avançado (alta incidência de doentes no estadió III e IV) e a menor sobrevida (Yamanaka, Friess et al. 1993).

Uegaki et al. (1997) analisaram a expressão de EGF e EGFR em tecidos tumoral pancreático e tecido tumoral pancreático metastático em 60 e 26 pacientes, respectivamente. Observaram que a expressão do EGFR no tecido pancreático tumoral foi de 43% e no tecido metastático de 46%, não havendo diferença significativa entre estes grupos. Estes achados estão de acordo com o encontrado no presente estudo, embora Uegaki et al. não tenham estudado as

metástases linfonodais, mas as hepáticas. A sobrevida mediana dos pacientes com expressão positiva de EGFR (EGFR+) foi de 22,7 meses e dos pacientes com expressão negativa (EGFR-), 25 meses, não havendo diferença significativa entre os dois grupos. Entretanto, quando avaliaram a coexpressão dos marcadores, observaram que os pacientes EGFR+EGF+ apresentaram sobrevida significativamente menor do que os demais grupos (EGFR-EGF+, EGFR+EGF-, EGFR-EGF-). Concluem que a expressão do EGFR e seu ligante apresentam influência na sobrevida dos pacientes com CaPa (Uegaki, Nio et al. 1997).

Dong et al. (1998) avaliaram a expressão do EGFR e do EGF em 57 pacientes chineses e observaram incidência de 68,4% e 73,7%, respectivamente. A positividade na expressão de ambos os marcadores foi de 61,4%. Houve correlação entre positividade de ambos os marcadores e prognóstico; nos indivíduos com EGF negativo, e EGFR negativo a sobrevida mediana era de 17,2 meses e nos indivíduos EGF positivo e EGFR positivo de 9,9 meses ($p=0,03$). Também observaram diferença na sobrevida, quando havia positividade em um dos marcadores estudados (EGFR+EGF- e EGFR-EGF+ com sobrevida mediana de 9,9 meses), em relação aos indivíduos EGFR+EGF+ ($p=0,02$). Não demonstraram associação da expressão de EGFR com gênero, idade, local do tumor, estágio e diferenciação (Dong, Nio et al. 1998).

Zhang et al. (2002) avaliaram a expressão do EGFR em face de diferentes variáveis clínicas e patológicas; sua expressão não esteve associada a este elenco: gênero, idade, tamanho tumoral, local do tumor e grau de diferenciação. Houve associação somente com a presença de metástases e quanto ao estadio da doença (maior expressão nos estadios III e IV) (Zhang and Yuan 2002).

Tobita et al. (2003), estudando o tecido de 77 pacientes portadores de CaPa, observaram expressão em 41,6%, estando relacionada ao gênero, à diferenciação tumoral e à presença de metástases (Tobita, Kijima et al. 2003). A presente casuística também evidenciou maior expressão do EGFR no gênero masculino, entretanto não esteve associada à diferenciação tumoral.

Ueda et al. (2006) avaliaram a expressão citoplasmática e de membrana do EGFR. Observaram que a expressão de membrana não esteve associada à diferenciação ou à sobrevida dos pacientes. Já a expressão citoplasmática esteve associada à diferenciação e à sobrevida dos pacientes. Neste estudo, não há menção quanto às correlações com as variáveis clínicas, como gênero, idade e estágio (Ueda, Fukamachi et al. 2006).

Tsiambas et al. (2006), estudando a expressão do EGFR em 50 tumores de pâncreas (29 homens e 21 mulheres), observaram expressão positiva em 58% dos tecidos e correlação com o estágio da doença. Não observaram relação com a diferenciação tumoral. Quando

compararam a expressão citoplasmática à expressão de membrana, aquela esteve associada a tumores em estádios mais avançados (Tsiambas, Karameris et al. 2006).

Dancer et al. (2007) observaram que 65% dos pacientes portadores de CaPa apresentaram expressão positiva para EGFR, havendo concordância de 60% na expressão da proteína em relação à amplificação gênica (hibridização *in situ*). Neste estudo, que englobou 32 pacientes (12 homens e 20 mulheres), submetidos a suposto tratamento curativo, não houve correlação da expressão do EGFR com gênero, idade ou estágio clínico (Dancer, Takei et al. 2007).

Cumprе salientar que a expressão da proteína pode ou não acontecer na reação imuno-histoquímica, e esta expressão pode ser influenciada por inúmeros fatores, desde a heterogeneidade na produção do anticorpo, às diferenças no processamento do tecido, à falta de padronização até às diferenças interobservadores que podem ocorrer (Te Velde, Franke et al. 2009). Métodos que possam avaliar a amplificação gênica e a mutação que eventualmente acontecem no gene do EGFR já são disponíveis, mas com elevado custo, o que torna restrita a sua utilização rotineira.

Em estudo realizado previamente no SCVBP do HCFMUSP (Perini, Montagnini et al. 2008), entre as variáveis encontradas que apresentaram influência na sobrevida do pacientes, na análise univariada, observou-se que os pacientes do gênero feminino

apresentavam maior sobrevida que os do gênero masculino. No presente estudo, os pacientes do gênero masculino apresentaram mais tumores indiferenciados (17,1% versus 2,1% e $p=0,03$); os tumores nos indivíduos do gênero masculino apresentaram mais invasão vascular ($p=0,001$) e expressaram mais o EGFR na membrana do tecido tumoral (50% versus 23,5% e $p=0,03$). Este último achado foi descrito previamente por Tobita et al. (Tobita, Kijima et al. 2003), mas não foi confirmado por outros autores (Lemoine, Hughes et al. 1992; Yamanaka 1992; Friess, Berberat et al. 1996; Dong, Nio et al. 1998; Friess, Guo et al. 1999; Ueda, Fukamachi et al. 2006). Entre as inúmeras variáveis que podem contribuir para a agressividade tumoral, a maior expressão de EGFR na membrana celular dos pacientes do gênero masculino pode em parte explicar a menor sobrevida destes indivíduos, muito embora isto não se tenha confirmado na análise multivariada. Press et al. (2008) encontraram diferença na sobrevida de pacientes portadores de câncer colorretal metastático do gênero masculino em relação ao feminino quando analisaram o polimorfismo do EGFR no codon 497 (HER-1 R497K) e no dinucleotídeo (CA)_n no íntron 1 (Press, Zhang et al. 2008). Pacientes do gênero masculino tiveram sobrevida pior em relação ao feminino, sugerindo relação entre o polimorfismo genético do EGFR e o gênero. Não há estudo semelhante em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático.

A ressecção do eixo mesentérico-portal ainda gera dúvidas em relação à sobrevida; alguns estudos mostram que não há alteração na sobrevida (Takahashi, Ogata et al. 1994; Sperti, Pasquali et al. 1996; Leach, Lee et al. 1998; Bachellier, Nakano et al. 2001; van Geenen, ten Kate et al. 2001; Nakagohri, Kinoshita et al. 2003; Tseng, Raut et al. 2004). Outros mostram menor sobrevida dos indivíduos submetidos à ressecção venosa (Allema, Reinders et al. 1994; Fuhrman, Leach et al. 1996; Roder, Stein et al. 1996; Sperti, Pasquali et al. 1996; Launois, Stasik et al. 1999). No presente estudo a ressecção venosa portal influenciou a sobrevida nas análises uni e multivariada, representando risco de morte de 2,2 vezes em relação aos pacientes não submetidos à ressecção venosa. A ressecção venosa portal esteve associada à margem pancreática positiva, estágio clínico e invasão do tecido peripancreático neste estudo. Quando se estudou a ressecção venosa quanto à expressão de EGFR, nenhuma diferença foi observada em sua expressão. Não há, na literatura pesquisada, estudo sobre a correlação entre a expressão de EGFR na membrana celular do tecido tumoral e a ressecção venosa portal.

A margem de ressecção cirúrgica apresenta forte influência na sobrevida; indivíduos R1 têm a sobrevida aumentada com o tratamento adjuvante (Neoptolemos, Stocken et al. 2004). A incidência de margem cirúrgica comprometida neste estudo não difere da literatura médica (15 a 30%)(Trede, Schwall et al. 1990; Sohn, Yeo et al. 2000;

Cooperman 2001; Neoptolemos, Stocken et al. 2001). Quando se avaliou a expressão do EGFR de membrana em relação à margem cirúrgica, observou-se distribuição semelhante quanto à expressão nos dois grupos (margem positiva e margem negativa); 45,5% dos pacientes com margem positiva expressavam EGFR.

Estratificar, classificar, mensurar e inferir comportamento tumoral ainda não é realidade no adenocarcinoma pancreático. Podemos medir o tamanho tumoral e com isto relacioná-lo à sobrevida; mas em muitos estudos o tamanho da lesão não foi associado à maior sobrevida; em outros os pacientes que sobreviveram mais de 5 anos apresentavam tumores com mais de 3 cm de diâmetro.

Se, em relação ao tamanho tumoral, as casuísticas podem ser conflitantes, quanto à expressão do EGFR, parece não haver influência do diâmetro da neoplasia nas diferentes publicações (Lemoine, Hughes et al. 1992; Yamanaka 1992; Friess, Berberat et al. 1996; Dong, Nio et al. 1998; Friess, Guo et al. 1999; Ueda, Fukamachi et al. 2006). Isto também foi confirmado no presente estudo.

No CaPa o acometimento linfonodal parece estar mais relacionado à agressividade tumoral do que à ressecção cirúrgica inadequada. E a cadeia linfonodal acometida pelo tumor parece desempenhar papel importante no prognóstico dos pacientes com CaPa (Connor, Bosonnet et al. 2004).

Se, por um lado, o cirurgião pode padronizar a ressecção linfonodal, a agressividade tumoral inata pode ser mais bem estudada com marcadores moleculares. Partindo do pressuposto de que a linfodectomia foi adequadamente realizada, a ausência de acometimento linfonodal, perceptível nos estudos rotineiros, não significa ausência de metástase. Com o intuito de corretamente estadiar estes pacientes, Demeure et al. (1998) avaliaram a presença de micrometástases linfonodais (Demeure, Doffek et al. 1998a; Demeure, Doffek et al. 1998b). Verificaram que pelo menos em um linfonodo ressecado em 16 (73%) dos 22 pacientes com estadió I (IA e IB) apresentavam micrometástases linfonodais não detectáveis pelos métodos convencionais de coloração histológica; mas foram detectados com a utilização de PCR (*polimerase chain reaction*) para mutação do K-ras. Isto pode, em parte, explicar o prognóstico ruim dos pacientes classificados em suposto Estádio I.

No presente estudo, que avaliou somente pacientes submetidos à ressecção cirúrgica com intuito curativo, estudou-se a expressão do EGFR no tecido linfonodal metastático; observou-se que havia concordância quanto à sua expressão em relação ao tumor primário e discordância em relação ao tecido não tumoral. Este fato, não relatado previamente na literatura médica, tem sido demonstrado em outros tumores do aparelho digestivo, notadamente nos tumores de cólon (Italiano, Saint-Paul et al. 2005; Bralet, Paule et al. 2007; Deng,

Kurland et al. 2009). Neste tipo de tumor, a diferente expressão do EGFR pode, em parte, ser responsável pela ausência de resposta à terapia anti-EGFR.

Resta saber se os linfonodos livres de tumor se apresentam livres da expressão do EGFR, o que poderia comprometer a sobrevida do pacientes. Na literatura médica pesquisada, não se encontrou estudo que tivesse realizado este tipo de análise no adenocarcinoma pancreático.

Partindo do pressuposto de que o comportamento tumoral é fator crucial na sobrevida, a diferenciação tumoral, refletindo a imaturidade das células tumorais, está implicada na sobrevida dos pacientes com tumores de pâncreas. Os pacientes portadores de tumores bem diferenciados apresentam sobrevida estatisticamente maior que os portadores de tumores pouco diferenciados (Geer e Brennan 1993; Conlon, Klimstra et al. 1996; Sperti, Pasquali et al. 1996; Sohn, Yeo et al. 2000). No presente estudo, esta assertiva não foi confirmada, juntamente com outras casuísticas, que não conferem à diferenciação este poder de associação (Cameron, Crist et al. 1991; Connor, Bosonnet et al. 2004; Han, Jang et al. 2006). Quanto à expressão do EGFR, alguns estudos sugerem haver associação entre a diferenciação tumoral e a expressão de EGFR (Tobita, Kijima et al. 2003) e outros, não (Dong, Nio et al. 1998; Zhang and Yuan 2002; Ueda, Ogata et al. 2004; Tsiambas, Karameris et al. 2006). Na

presente trabalho, não foi encontrada associação entre a expressão do EGFR e a diferenciação tumoral.

A invasão perineural, refletindo o neurotropismo das células tumorais, apresenta influencia na sobrevida dos pacientes (Takahashi, Ishikura et al. 1997). Esta característica do câncer do pâncreas se deve, em parte, à capacidade que o tumor tem de invadir e se disseminar pelo feixe nervoso em direção ao plexo celíaco e retroperitônio (Hirai, Kimura et al. 2002). Este crescimento em direção posterior tem sido associado ao acometimento da margem de ressecção tumoral; entretanto estudos realizados com marcadores moleculares têm evidenciado que a produção de neurregulinas nas terminações nervosas exerce papel trófico, orientando o crescimento do tumor em direção aos filetes nervosos. Mesmo que as margens de ressecção estejam livres de neoplasia, a migração de células em direção ao plexo celíaco seria a responsável pela recidiva local após a ressecção tumoral (Takahashi, Funahashi et al. 2004; Ito, Okada et al. 2005; Ceyhan, Giese et al. 2006; Han, Zhang et al. 2007). Na presente casuística, demonstrou-se que a invasão neural apresenta correlação com a sobrevida na análise uni e multivariada, representado risco de morte duas vezes maior. Quando relacionada com a expressão do EGFR, não se encontrou associação estatística.

No que tange à invasão vascular, alguns estudos mostraram que a invasão vascular está associada à menor sobrevida; a sobrevida

mediana dos pacientes sem invasão vascular é de 20,6 meses e a dos pacientes com invasão vascular, 11,9 meses (Cameron, Crist et al. 1991; Sperti, Pasquali et al. 1996; Wagner, Redaelli et al. 2004). Isto reflete a agressividade tumoral, porquanto a invasão perineural está associada à recorrência local, à invasão vascular e à disseminação hematogênica do tumor (Hirai, Kimura et al. 2002; Ceyhan, Giese et al. 2006). No presente estudo, observa-se que 40 % dos pacientes com invasão vascular apresentaram expressão positiva na membrana celular para o EGFR, sem significância. Quanto ao gênero, 81% dos pacientes que apresentaram invasão vascular eram do gênero masculino, sendo esta a única variável que apresentou associação significativa.

Na maior parte dos tumores do trato digestivo, a denominação de precoce aos tumores que apresentam os melhores prognósticos tem sido adotada na literatura médica. Em relação ao câncer do pâncreas, esta prerrogativa não parece ser adequada. Trede et al. (2001) observaram que apenas nove (2,9%) de seus 308 pacientes submetidos a ressecção preenchiam o critério de tumor precoce (menores que 2 cm, sem acometimento linfonodal); destes, apenas seis (1,9%) estavam vivos após 5 anos (Trede, Richter et al. 2001). Na presente casuística, cinco pacientes apresentaram tumores menores que 2 cm (media de 1,8cm). Destes, 60% eram tumores bem diferenciados e a expressão do EGFR foi negativa em 75% (3/4). A

sobrevida média foi de 29,3m (mediana de 24meses); um dos cinco pacientes apresentava margem de ressecção cirúrgica positiva.

Já entre os sete pacientes que sobreviveram mais do que 5 anos, seis apresentavam tumores maiores que 2 cm: média de 4,8cm e mediana de 3,7cm. Embora possamos observar neste estudo que os pacientes nos estádios menos avançados tenham sobrevida maior, com diferença estatística, os pacientes que sobreviveram mais de 3 e 5 anos foram heterogêneos quanto às variáveis patológicas; entretanto, apresentam em comum o fato de terem margem de ressecção sem acometimento neoplásico.

Isto talvez seja reflexo do comportamento biológico do tumor em detrimento ao seu estágio, o que justificaria a busca de alternativas não cirúrgicas para o tratamento desta neoplasia, visto que a qualidade do tratamento cirúrgico oferecido parece ter atingido níveis aceitáveis.

Cabe ressaltar que os sobreviventes de longo prazo (sobrevida maior que 5 anos) têm merecido consideração especial. Embora o estágio clínico tenha influência na sobrevida dos pacientes com CaPa, a heterogeneidade dos indivíduos que apresentam sobrevida maior que 5 anos é patente. Adham et al. (2008), numa série de 30 pacientes com sobrevida maior que cinco anos e menor que 20 anos (mediana de 7,3anos), que envolveu três diferentes hospitais franceses, observaram que 23 (76,6%) pacientes apresentaram tumores maiores que 2cm; 13 (43,3%) apresentavam acometimento linfonodal, 15 (50%)

e tumores moderadamente diferenciados. Entretanto todos haviam sido submetidos à ressecção R0. Esta última assertiva corrobora o fato de que, apesar de a agressividade tumoral ser uma característica importante, o papel do cirurgião é imprescindível (Adham, Jaeck et al. 2008). Estudos norte-americanos também confirmam que um dos fatores implicados na sobrevida de longo prazo é a margem de ressecção livre de doença (Riall, Nealon et al. 2006; Ferrone, Brennan et al. 2008; Schnelldorfer, Ware et al. 2008; Katz, Wang et al. 2009).

Na presente casuística, apenas sete pacientes sobreviveram mais que 5 anos (mediana de 69,6 meses). Destes, quatro (57,1%) eram mulheres, seis (85,7%) apresentavam tumores maiores que 2cm, dois (28,5%) apresentavam acometimento linfonodal, e em quatro (57,1) os tumores eram moderadamente diferenciados. Um fator presente em todos os pacientes foi a ressecção com margem livre de tumor (R0). Quanto à expressão de membrana do EGFR na membrana celular do tecido tumoral, 38,2% dos pacientes que faleceram em até cinco anos apresentaram expressão positiva, ao passo que em nenhum sobrevivente com mais de cinco anos a expressão era positiva, muito embora não houvesse diferença significativa.

Recentemente, Moore et al. (2007) verificaram que o erlotinib, associado à gemcitabina, aumentou a sobrevida dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático (Moore, Goldstein et al. 2007). Este estudo fase III mostrou sobrevida aumentada de 22% em

relação ao grupo que não recebeu erlotinib; sobrevida de 1 ano de 23% em comparação a 19%.

Isto abriu oportunidades e esperanças no tratamento do adenocarcinoma pancreático. A terapia alvo ganhou confirmação clínica; como aconteceu com o adenocarcinoma de cólon em relação à mutação do gene K-ras, no carcinoma de mama em relação à superexpressão de HER2, talvez no CaPa o estudo das moléculas expressas ou dos genes ativados possa influir no tratamento adjuvante ou neoadjuvante. O estudo canadense (Moore, Goldstein et al. 2007), entretanto, não encontrou maior resposta à quimioterapia nos pacientes cujos tumores expressavam EGFR. Isto pode ter acontecido por alguns motivos. Primeiro, porque não houve preocupação em estudar somente os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica, uma vez que pacientes com doença metastática foram incluídos; segundo, sabe-se que, em tumores avançados, a heterogeneidade tumoral pode variar, o que poderia levar ao crescimento de clones celulares diferentes do tumor primário; terceiro, não há descrição no estudo acerca da origem do tecido amostrado (se do tumor pancreático primário, se do tecido metastático, se do tecido linfonodal acometido), o que pode interferir no resultado. Por último, a metodologia do estudo utilizou outro critério para positividade na marcação da membrana.

Os achados descritos no presente estudo abrem portas a novos estudos com intuito de avaliar a resposta ao tratamento com inibidores

da tirosinaquinase em um grupo seletivo de pacientes, submetidos a tratamento com intuito curativo e cujos tumores apresentam positividade na marcação de membrana do EGFR.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, pode-se concluir com as seguintes asseverações.

- 1) O tecido pancreático não tumoral não superexpressou EGFR na membrana celular e no citoplasma.
- 2) Não existe diferença na expressão citoplasmática do EGFR entre os tecidos não tumoral, tumoral e metastático linfonodal.
- 3) A expressão do EGFR na membrana celular é significativamente maior nos tecidos tumoral e metastático linfonodal, quando comparados ao tecido não tumoral.
- 4) Dentre os dados clinicopatológicos estudados, somente o gênero masculino foi associado a maior expressão do EGFR de membrana no tecido tumoral.
- 5) A expressão do EGFR na membrana celular do tecido tumoral diminuiu significativamente a sobrevida dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Adham, M., D. Jaeck, J. Le Borgne, E. Oussoultzoglou, M. P. Chenard-Neu, J. F. Mosnier, J. Y. Scoazec, F. Mornex and C. Partensky "Long-term survival (5-20 years) after pancreatectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a series of 30 patients collected from 3 institutions." *Pancreas* 2008; 37:(4); 352-7.
- Allema, J. H., M. E. Reinders, T. M. van Gulik, D. J. van Leeuwen, L. T. de Wit, P. C. Verbeek and D. J. Gouma "Portal vein resection in patients undergoing pancreatoduodenectomy for carcinoma of the pancreatic head." *Br J Surg* 1994; 81:(11); 1642-6.
- Alves, V. A. F. B., C.E.; Vassalo, J. "Manual de imuno-histoquímica." *Sociedade Brasileira de Patologia, São Paulo* 1999.
- Amikura, K., M. Kobari and S. Matsuno "The time of occurrence of liver metastasis in carcinoma of the pancreas." *Int J Pancreatol* 1995; 17:(2); 139-46.
- Bachellier, P., H. Nakano, P. D. Oussoultzoglou, J. C. Weber, K. Boudjema, P. D. Wolf and D. Jaeck "Is pancreaticoduodenectomy with mesentericoportal venous resection safe and worthwhile?" *Am J Surg* 2001; 182:(2); 120-9.
- Bralet, M. P., B. Paule, B. Falissard, R. Adam and C. Guettier "Immunohistochemical variability of epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver metastases from colonic carcinomas." *Histopathology* 2007; 50:(2); 210-6.
- Cameron, J. L., D. W. Crist, J. V. Sitzmann, R. H. Hruban, J. K. Boitnott, A. J. Seidler and J. Coleman "Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer." *Am J Surg* 1991; 161:(1); 120-4; discussion 4-5.
- Cameron, J. L., T. S. Riall, J. Coleman and K. A. Belcher "One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies." *Ann Surg* 2006; 244:(1); 10-5.
- Carneiro, F., C. Oliveira, M. Leite and R. Seruca "Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer." *Semin Diagn Pathol* 2008; 25:(4); 274-87.
- Ceyhan, G. O., N. A. Giese, M. Erkan, A. G. Kerscher, M. N. Wente, T. Giese, M. W. Buchler and H. Friess "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." *Ann Surg* 2006; 244:(2); 274-81.
- Ciardiello, F. "Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment." *Future Oncol* 2005; 1:(2); 221-34.
- Ciardiello, F. and G. Tortora "EGFR antagonists in cancer treatment." *N Engl J Med* 2008; 358:(11); 1160-74.
- Ciardiello, F., T. Troiani, R. Bianco, M. Orditura, F. Morgillo, E. Martinelli, M. P. Morelli, T. Cascone and G. Tortora "Interaction

- between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy." *Ann Oncol* 2006; 17 Suppl 7: vii109-14.
- Conlon, K. C., D. S. Klimstra and M. F. Brennan "Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors." *Ann Surg* 1996; 223:(3); 273-9.
- Connor, S., L. Bosonnet, P. Ghaneh, N. Alexakis, M. Hartley, F. Campbell, R. Sutton and J. P. Neoptolemos "Survival of patients with periampullary carcinoma is predicted by lymph node 8a but not by lymph node 16b1 status." *Br J Surg* 2004; 91:(12); 1592-9.
- Cooperman, A. M. "Pancreatic cancer: the bigger picture." *Surg Clin North Am* 2001; 81:(3); 557-74.
- Coussens, L., T. L. Yang-Feng, Y. C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke and et al. "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." *Science* 1985; 230:(4730); 1132-9.
- Crocetti, E., R. Capocaccia, C. Casella, S. Guzzinati, S. Ferretti, S. Rosso, C. Sacchettini, A. Spitale, F. Stracci and R. Tumino "Population-based incidence and mortality cancer trends (1986-1997) from the network of Italian cancer registries." *Eur J Cancer Prev* 2004; 13:(4); 287-95.
- Dancer, J., H. Takei, J. Y. Ro and M. Lowery-Nordberg "Coexpression of EGFR and HER-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative study using immunohistochemistry correlated with gene amplification by fluorescent in situ hybridization." *Oncol Rep* 2007; 18:(1); 151-5.
- Delcore, R., F. J. Rodriguez, J. Forster, A. S. Hermreck and J. H. Thomas "Significance of lymph node metastases in patients with pancreatic cancer undergoing curative resection." *Am J Surg* 1996; 172:(5); 463-8; discussion 8-9.
- Demeure, M. J., K. M. Doffek, R. A. Komorowski, P. N. Redlich, Y. R. Zhu, B. A. Erickson, P. S. Ritch, H. A. Pitt and S. D. Wilson "Molecular metastases in stage I pancreatic cancer: improved survival with adjuvant chemoradiation." *Surgery* 1998a; 124:(4); 663-9.
- Demeure, M. J., K. M. Doffek, R. A. Komorowski and S. D. Wilson "Adenocarcinoma of the pancreas: detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay." *Cancer* 1998b; 83:(7); 1328-34.
- Deng, Y., B. F. Kurland, J. Wang, J. Bi, W. Li, S. Rao, P. Lan, T. Lin and E. Lin "High Epidermal Growth Factor Receptor Expression

- in Metastatic Colorectal Cancer Lymph Nodes May Be More Prognostic of Poor Survival Than in Primary Tumor." *Am J Clin Oncol* 2009; 32(3); 245-52.
- Diniz, A. L. "Análise da expressão de marcadores imunohistoquímicos relacionados a angiogênese (VEGF), linfangiogênese (D2-40) e inflamação (COX-2) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo." *Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção do título de Mestre em Ciências* 2008.
- Dong, M., Y. Nio, K. J. Guo, K. Tamura, Y. L. Tian and Y. T. Dong "Epidermal growth factor and its receptor as prognostic indicators in Chinese patients with pancreatic cancer." *Anticancer Res* 1998; 18:(6B); 4613-9.
- Dugan, M. C., S. T. Dergham, R. Kucway, K. Singh, L. Biernat, W. Du, V. K. Vaitkevicius, J. D. Crissman and F. H. Sarkar "HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival." *Pancreas* 1997; 14:(3); 229-36.
- Ferrone, C. R., M. F. Brennan, M. Gonen, D. G. Coit, Y. Fong, S. Chung, L. Tang, D. Klimstra and P. J. Allen "Pancreatic adenocarcinoma: the actual 5-year survivors." *J Gastrointest Surg* 2008; 12:(4); 701-6.
- Friess, H., P. Berberat, M. Schilling, J. Kunz, M. Korc and M. W. Buchler "Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors." *J Mol Med* 1996; 74:(1); 35-42.
- Friess, H., X. Z. Guo, B. C. Nan, O. Kleeff and M. W. Buchler "Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis." *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 110-21.
- Fuhrman, G. M., S. D. Leach, C. A. Staley, J. C. Cusack, C. Charnsangavej, K. R. Cleary, A. K. El-Naggar, C. J. Fenoglio, J. E. Lee and D. B. Evans "Rationale for en bloc vein resection in the treatment of pancreatic adenocarcinoma adherent to the superior mesenteric-portal vein confluence. Pancreatic Tumor Study Group." *Ann Surg* 1996; 223:(2); 154-62.
- Galizia, G., E. Lieto, F. Ferraraccio, F. De Vita, P. Castellano, M. Orditura, V. Imperatore, A. La Mura, G. La Manna, M. Pinto, G. Catalano, C. Pignatelli and F. Ciardiello "Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery." *Ann Surg Oncol* 2006; 13:(6); 823-35.
- Galizia, G., E. Lieto, M. Orditura, P. Castellano, A. L. Mura, V. Imperatore, M. Pinto, A. Zamboli, F. De Vita and F. Ferraraccio "Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients

- undergoing curative surgery." *World J Surg* 2007; 31:(7); 1458-68.
- Gancberg, D., A. Di Leo, F. Cardoso, G. Rouas, M. Pedrocchi, M. Paesmans, A. Verhest, C. Bernard-Marty, M. J. Piccart and D. Larsimont "Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites." *Ann Oncol* 2002; 13:(7); 1036-43.
- Geer, R. J. and M. F. Brennan "Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma." *Am J Surg* 1993; 165:(1); 68-72; discussion -3.
- Ghaneh, P. and J. P. Neoptolemos "Conclusions from the European Study Group for Pancreatic Cancer adjuvant trial of chemoradiotherapy and chemotherapy for pancreatic cancer." *Surg Oncol Clin N Am* 2004; 13:(4); 567-87.
- Gong, Y., D. J. Booser and N. Sneige "Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma." *Cancer* 2005; 103:(9); 1763-9.
- Grann, V. R., A. B. Troxel, N. J. Zojwalla, J. S. Jacobson, D. Hershman and A. I. Neugut "Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma." *Cancer* 2005; 103:(11); 2241-51.
- Gusterson, B. A., R. D. Gelber, A. Goldhirsch, K. N. Price, J. Save-Soderborgh, R. Anbazhagan, J. Styles, C. M. Rudenstam, R. Golouh, R. Reed and et al. "Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group." *J Clin Oncol* 1992; 10:(7); 1049-56.
- Han, L., Z. Zhang, W. Qin and W. Sun "Neurotrophic receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients?" *Med Hypotheses* 2007; 68:(2); 407-9.
- Han, S. S., J. Y. Jang, S. W. Kim, W. H. Kim, K. U. Lee and Y. H. Park "Analysis of long-term survivors after surgical resection for pancreatic cancer." *Pancreas* 2006; 32:(3); 271-5.
- Hanahan, D., A. Lanzavecchia and E. Mihich "Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors." *Cancer Res* 2003; 63:(11); 3005-8.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg "The hallmarks of cancer." *Cell* 2000; 100:(1); 57-70.
- Hanna, W., P. O'Malley F, P. Barnes, R. Berendt, L. Gaboury, A. Magliocco, N. Pettigrew, S. Robertson, S. Sengupta, B. Tetu and T. Thomson "Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer." *Curr Oncol* 2007; 14:(4); 149-53.
- Harris, L. N., V. Liotcheva, G. Broadwater, M. J. Ramirez, P. Maimonis, S. Anderson, T. Everett, D. Harpole, M. B. Moore, D. A. Berry, D. Rizzeri, J. J. Vredenburgh and R. C. Bentley "Comparison of

- methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* 2001; 19:(6); 1698-706.
- Heppner, G. H. "Cancer cell societies and tumor progression." *Stem Cells* 1993; 11:(3); 199-203.
- Hirai, I., W. Kimura, K. Ozawa, S. Kudo, K. Suto, H. Kuzu and A. Fuse "Perineural invasion in pancreatic cancer." *Pancreas* 2002; 24:(1); 15-25.
- Imamura, Y. and T. Sobue "Cancer statistics digest. Mortality trend of colon, rectal, liver, "gallbladder and biliary tract" and pancreas cancer in Japan by birth cohort." *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34:(8); 491-3.
- Italiano, A., M. C. Saint-Paul, F. X. Caroli-Bosc, E. Francois, A. Bourgeon, D. Benchimol, J. Gugenheim and J. F. Michiels "Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications." *Ann Oncol* 2005; 16:(9); 1503-7.
- Ito, Y., Y. Okada, M. Sato, H. Sawai, H. Funahashi, T. Murase, T. Hayakawa and T. Manabe "Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family members and their receptors in pancreatic cancers." *Surgery* 2005; 138:(4); 788-94.
- Javle, M., J. Yu, C. Garrett, A. Pande, B. Kuvshinoff, A. Litwin, J. Phelan, 3rd, J. Gibbs and R. Iyer "Bevacizumab combined with gemcitabine and capecitabine for advanced pancreatic cancer: a phase II study." *Br J Cancer* 2009; 100:(12); 1842-5.
- Juergens, R. and J. Brahmer "Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer: who, which, when, and how?" *Curr Oncol Rep* 2007; 9:(4); 255-64.
- Kaplan, E. M., P. "Nonparametric estimation from incomplete observation." *J Am Stat Assoc.* 1958; 53: 457-81.
- Katz, M. H., H. Wang, J. B. Fleming, C. C. Sun, R. F. Hwang, R. A. Wolff, G. Varadhachary, J. L. Abbruzzese, C. H. Crane, S. Krishnan, J. N. Vauthey, E. K. Abdalla, J. E. Lee, P. W. Pisters and D. B. Evans "Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma." *Ann Surg Oncol* 2009; 16:(4); 836-47.
- Kaufman, M., B. Mehrotra, S. Limaye, S. White, A. Fuchs, Y. Lebowicz, S. Nissel-Horowitz and A. Thomas "EGFR expression in gallbladder carcinoma in North America." *Int J Med Sci* 2008; 5:(5); 285-91.
- Kayahara, M., T. Nagakawa, K. Ueno, T. Ohta, T. Takeda and I. Miyazaki "An evaluation of radical resection for pancreatic cancer based on the mode of recurrence as determined by autopsy and diagnostic imaging." *Cancer* 1993; 72:(7); 2118-23.

- Kim, E. S. "Cetuximab as a single agent or in combination with chemotherapy in lung cancer." *Clin Lung Cancer* 2004; 6 Suppl 2: S80-4.
- Kim, E. S., F. R. Khuri and R. S. Herbst "Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)." *Curr Opin Oncol* 2001; 13:(6); 506-13.
- Kleeff, J., H. Friess, P. O. Berberat, M. E. Martignoni, K. Z'Graggen and M. W. Buchler "Pancreatic cancer--new aspects of molecular biology research." *Swiss Surg* 2000; 6:(5); 231-4.
- Kloppel, G., G. Lingenthal, M. von Bulow and H. F. Kern "Histological and fine structural features of pancreatic ductal adenocarcinomas in relation to growth and prognosis: studies in xenografted tumours and clinico-histopathological correlation in a series of 75 cases." *Histopathology* 1985; 9:(8); 841-56.
- Kloppel, G. e. a. (2000). Ductal adenocarcinoma of the pancreas in Hamilton SR, Aaeltonen LA (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology of Tumours of the Digestive Tract, IARC Press: Lyon, 2000). Lyon, IARC Press.
- Korc, M. "Pancreatic cancer-associated stroma production." *Am J Surg* 2007; 194:(4 Suppl); S84-6.
- Kountourakis, P., K. Pavlakis, A. Psyrris, D. Rontogianni, N. Xiros, E. Patsouris, D. Pectasides and T. Economopoulos "Clinicopathologic significance of EGFR and Her-2/neu in colorectal adenocarcinomas." *Cancer J* 2006; 12:(3); 229-36.
- Kullmann, F., S. Hollerbach, M. M. Dollinger, J. Harder, M. Fuchs, H. Messmann, J. Trojan, E. Gabele, A. Hinke, C. Hollerbach and E. Endlicher "Cetuximab plus gemcitabine/oxaliplatin (GEMOXCET) in first-line metastatic pancreatic cancer: a multicentre phase II study." *Br J Cancer* 2009; 100:(7); 1032-6.
- Kuukasjarvi, T., J. Kononen, H. Helin, K. Holli and J. Isola "Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy." *J Clin Oncol* 1996; 14:(9); 2584-9.
- Launois, B., C. Stasik, E. Bardaxoglou, B. Meunier, J. P. Campion, L. Greco and F. Sutherland "Who benefits from portal vein resection during pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer?" *World J Surg* 1999; 23:(9); 926-9.
- Leach, S. D., J. E. Lee, C. Charnsangavej, K. R. Cleary, A. M. Lowy, C. J. Fenoglio, P. W. Pisters and D. B. Evans "Survival following pancreaticoduodenectomy with resection of the superior mesenteric-portal vein confluence for adenocarcinoma of the pancreatic head." *Br J Surg* 1998; 85:(5); 611-7.
- Lemoine, N. R., C. M. Hughes, C. M. Barton, R. Poulson, R. E. Jeffery, G. Kloppel, P. A. Hall and W. J. Gullick "The epidermal growth

- factor receptor in human pancreatic cancer." *J Pathol* 1992; 166:(1); 7-12.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese "Pancreatic cancer." *Lancet* 2004; 363:(9414); 1049-57.
- Luttges, J., S. Hahn and G. Kloppel "Where and when does pancreatic carcinoma start?" *Med Klin (Munich)* 2004; 99:(4); 191-5.
- Michaud, D. S. "Epidemiology of pancreatic cancer." *Minerva Chir* 2004; 59:(2); 99-111.
- Ministerio da Saúde, INCA. (2001). Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil. Tendência no período de 1969-1998.
- Moasser, M. M. "The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis." *Oncogene* 2007; 26:(45); 6469-87.
- Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski and W. Parulekar "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." *J Clin Oncol* 2007; 25:(15); 1960-6.
- Moraes, V. M. de (2002). Evolução do padrão alimentar e tendência da mortalidade por câncer de pâncreas nas capitais do Brasil, 1980-1997 / Evolution of feeding behavior trends of the mortality the pancreatic neoplasms in Brazil states: 1980-1997. Apresentada a Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro - Brasil: 106p.
- Nakagohri, T., T. Kinoshita, M. Konishi, K. Inoue and S. Takahashi "Survival benefits of portal vein resection for pancreatic cancer." *Am J Surg* 2003; 186:(2); 149-53.
- Neoptolemos, J. P., R. C. Russell, S. Bramhall and B. Theis "Low mortality following resection for pancreatic and periampullary tumours in 1026 patients: UK survey of specialist pancreatic units. UK Pancreatic Cancer Group." *Br J Surg* 1997; 84:(10); 1370-6.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, J. A. Dunn, J. Almond, H. G. Beger, P. Pederzoli, C. Bassi, C. Dervenis, L. Fernandez-Cruz, F. Lacaine, J. Buckels, M. Deakin, F. A. Adab, R. Sutton, C. Imrie, I. Ihse, T. Tihanyi, A. Olah, S. Pedrazzoli, D. Spooner, D. J. Kerr, H. Friess and M. W. Buchler "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:(6); 758-68.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr and M.

- W. Buchler "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." *N Engl J Med* 2004; 350:(12); 1200-10.
- Nitecki, S. S., M. G. Sarr, T. V. Colby and J. A. van Heerden "Long-term survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. Is it really improving?" *Ann Surg* 1995; 221:(1); 59-66.
- Parker, S. L., T. Tong, S. Bolden and P. A. Wingo "Cancer statistics, 1996." *CA Cancer J Clin* 1996; 46:(1); 5-27.
- Perik, P. J., M. N. Lub-De Hooge, J. A. Gietema, W. T. van der Graaf, M. A. de Korte, S. Jonkman, J. G. Kosterink, D. J. van Veldhuisen, D. T. Sleijfer, P. L. Jager and E. G. de Vries "Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* 2006; 24:(15); 2276-82.
- Perini, M. V. "Estudo dos fatores clinico-patológicos no prognóstico de pacientes submetidos a ressecção de adenocarcinoma pancreático." *Dissertação apresentada a FMUSP para obtenção do título de Mestre em Cirurgia* 2005.
- Perini, M. V., A. L. Montagnini, J. Jukemura, S. Penteado, E. E. Abdo, R. Patzina, I. Cecconello and J. E. M. Cunha "Clinical and pathologic prognostic factors for curative resection for pancreatic cancer." *HPB (Oxford)* 2008; 10:(5); 356-62.
- Pinto, F. G. C., Paulo Roberto. "Mortalidade por neoplasias no Brasil (1980/1983/1985): agrupamento dos Estados, comportamento e tendências." *Rev Saude Publica* 1991; 25:(4); 276-81.
- Press, O. A., W. Zhang, M. A. Gordon, D. Yang, G. Lurje, S. Iqbal, A. El-Khoueiry and H. J. Lenz "Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphisms in metastatic colon cancer." *Cancer Res* 2008; 68:(8); 3037-42.
- Riall, T. S., W. H. Nealon, J. S. Goodwin, D. Zhang, Y. F. Kuo, C. M. Townsend, Jr. and J. L. Freeman "Pancreatic cancer in the general population: Improvements in survival over the last decade." *J Gastrointest Surg* 2006; 10:(9); 1212-23; discussion 23-4.
- Richter, A., M. Niedergethmann, J. W. Sturm, D. Lorenz, S. Post and M. Trede "Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience." *World J Surg* 2003; 27:(3); 324-9.
- Ritts, R. P., HA. "Ca 19-9 in pancreatic cancer." *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7: 93-1001.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu and S. F. Lin "The protein tyrosine kinase family of the human genome." *Oncogene* 2000; 19:(49); 5548-57.

- Roder, J. D., H. J. Stein and J. R. Siewert "Carcinoma of the periampullary region: who benefits from portal vein resection?" *Am J Surg* 1996; 171:(1); 170-4; discussion 4-5.
- Schechter, A. L., M. C. Hung, L. Vaidyanathan, R. A. Weinberg, T. L. Yang-Feng, U. Francke, A. Ullrich and L. Coussens "The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor." *Science* 1985; 229:(4717); 976-8.
- Schmidt, C. M., E. S. Powell, C. T. Yiannoutsos, T. J. Howard, E. A. Wiebke, C. A. Wiesenauer, J. A. Baumgardner, O. W. Cummings, L. E. Jacobson, T. A. Broadie, D. F. Canal, R. J. Goulet, Jr., E. A. Curie, H. Cardenes, J. M. Watkins, P. J. Loehrer, K. D. Lillemoe and J. A. Madura "Pancreaticoduodenectomy: a 20-year experience in 516 patients." *Arch Surg* 2004; 139:(7); 718-25.
- Schnelldorfer, T., A. L. Ware, M. G. Sarr, T. C. Smyrk, L. Zhang, R. Qin, R. E. Gullerud, J. H. Donohue, D. M. Nagorney and M. B. Farnell "Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: is cure possible?" *Ann Surg* 2008; 247:(3); 456-62.
- Scurtu, R., P. Bachellier, E. Oussoultzoglou, E. Rosso, R. Maroni and D. Jaeck "Outcome after pancreaticoduodenectomy for cancer in elderly patients." *J Gastrointest Surg* 2006; 10:(6); 813-22.
- Sergina, N. V. and M. M. Moasser "The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets." *Trends Mol Med* 2007; 13:(12); 527-34.
- Sirak, I., J. Petera, J. Hatlova, M. Vosmik, B. Melichar, J. Dvorak, Z. Zoul, V. Tycova, M. Lesko and M. Hajduch "Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor response to preoperative chemoradiation in locally advanced gastric carcinoma." *Strahlenther Onkol* 2008; 184:(11); 592-7.
- Sobin KL, W. C. e. "Classification of Malignant Tumours (6th ed) Wiley-Liss: New York." 2002.
- Sohn, T. A., C. J. Yeo, J. L. Cameron, L. Koniaris, S. Kaushal, R. A. Abrams, P. K. Sauter, J. Coleman, R. H. Hruban and K. D. Lillemoe "Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators." *J Gastrointest Surg* 2000; 4:(6); 567-79.
- Sperti, C., C. Pasquali, A. Piccoli and S. Pedrazzoli "Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas." *Br J Surg* 1996; 83:(5); 625-31.
- Steele, R. J., P. Kelly, B. Ellul and O. Eremin "Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer." *Br J Surg* 1990; 77:(12); 1352-4.

- Takahashi, H., H. Funahashi, H. Sawai, M. Sakamoto, Y. Matsuo, M. Yamamoto, Y. Okada, T. Hayakawa and T. Manabe "Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances nuclear factor-kappaB activity and invasive potential in human pancreatic cancer cells." *Pancreas* 2004; 29:(1); 22-7.
- Takahashi, S., Y. Ogata and T. Tsuzuki "Combined resection of the pancreas and portal vein for pancreatic cancer." *Br J Surg* 1994; 81:(8); 1190-3.
- Takahashi, T., H. Ishikura, T. Motohara, S. Okushiba, M. Dohke and H. Katoh "Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas." *J Surg Oncol* 1997; 65:(3); 164-70.
- Te Velde, E. A., A. C. Franke, R. van Hillegersberg, S. M. Elshof, R. W. de Weger, I. H. Borel Rinkes and P. J. van Diest "HER-family gene amplification and expression in resected pancreatic cancer." *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(10); 1098-104.
- Tobita, K., H. Kijima, S. Dowaki, H. Kashiwagi, Y. Ohtani, Y. Oida, H. Yamazaki, M. Nakamura, Y. Ueyama, M. Tanaka, S. Inokuchi and H. Makuuchi "Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis." *Int J Mol Med* 2003; 11:(3); 305-9.
- Trede, M., A. Richter and K. Wendl "Personal observations, opinions, and approaches to cancer of the pancreas and the periampullary area." *Surg Clin North Am* 2001; 81:(3); 595-610.
- Trede, M., G. Schwall and H. D. Saeger "Survival after pancreatoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality." *Ann Surg* 1990; 211:(4); 447-58.
- Tseng, J. F., C. P. Raut, J. E. Lee, P. W. Pisters, J. N. Vauthey, E. K. Abdalla, H. F. Gomez, C. C. Sun, C. H. Crane, R. A. Wolff and D. B. Evans "Pancreaticoduodenectomy with vascular resection: margin status and survival duration." *J Gastrointest Surg* 2004; 8:(8); 935-49; discussion 49-50.
- Tsiambas, E., A. Karameris, A. C. Lazaris, M. Talieri, J. K. Triantafillidis, P. Cheracakis, L. Manaios, K. Gerontopoulos, E. Patsouris and N. J. Lygidakis "EGFR alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a chromogenic in situ hybridization analysis based on tissue microarrays." *Hepatogastroenterology* 2006; 53:(69); 452-7.
- Ueda, S., K. Fukamachi, Y. Matsuoka, N. Takasuka, F. Takeshita, A. Naito, M. Iigo, D. B. Alexander, M. A. Moore, I. Saito, T. Ochiya and H. Tsuda "Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas." *Carcinogenesis* 2006; 27:(12); 2497-510.
- Ueda, S., S. Ogata, H. Tsuda, N. Kawarabayashi, M. Kimura, Y. Sugiura, S. Tamai, O. Matsubara, K. Hatsuse and H. Mochizuki "The correlation between cytoplasmic overexpression of

- epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma." *Pancreas* 2004; 29:(1); e1-8.
- Uegaki, K., Y. Nio, Y. Inoue, Y. Minari, Y. Sato, M. M. Song, M. Dong and K. Tamura "Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer." *Anticancer Res* 1997; 17:(5B); 3841-7.
- Van Cutsem, E., R. Aerts, K. Haustermans, B. Topal, W. Van Steenberghe and C. Verslype "Systemic treatment of pancreatic cancer." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:(3); 265-74.
- van Geenen, R. C., F. J. ten Kate, L. T. de Wit, T. M. van Gulik, H. Obertop and D. J. Gouma "Segmental resection and wedge excision of the portal or superior mesenteric vein during pancreatoduodenectomy." *Surgery* 2001; 129:(2); 158-63.
- van Heek, N. T., K. F. Kuhlmann, R. J. Scholten, S. M. de Castro, O. R. Busch, T. M. van Gulik, H. Obertop and D. J. Gouma "Hospital volume and mortality after pancreatic resection: a systematic review and an evaluation of intervention in the Netherlands." *Ann Surg* 2005; 242:(6); 781-8, discussion 8-90.
- Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess and M. W. Buchler "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." *Br J Surg* 2004; 91:(5); 586-94.
- Wang, K. L., T. T. Wu, I. S. Choi, H. Wang, E. Resetskova, A. M. Correa, W. L. Hofstetter, S. G. Swisher, J. A. Ajani, A. Rashid and C. T. Albarracin "Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome." *Cancer* 2007; 109:(4); 658-67.
- Wilkinson, N. W., J. D. Black, E. Roukhadze, D. Driscoll, S. Smiley, H. Hoshi, J. Geradts, M. Javle and M. Brattain "Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma." *J Gastrointest Surg* 2004; 8:(4); 448-53.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred, R. J. Cote, M. Dowsett, P. L. Fitzgibbons, W. M. Hanna, A. Langer, L. M. McShane, S. Paik, M. D. Pegram, E. A. Perez, M. F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S. E. Taube, R. Tubbs, G. H. Vance, M. van de Vijver, T. M. Wheeler and D. F. Hayes "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer." *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:(1); 18.
- Yacoub, L., H. Goldman and R. D. Odze "Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in

- Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis." *Mod Pathol* 1997; 10:(2); 105-12.
- Yamanaka, Y. "The immunohistochemical expressions of epidermal growth factors, epidermal growth factor receptors and c-erbB-2 oncoprotein in human pancreatic cancer." *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1992; 59:(1); 51-61.
- Yamanaka, Y., H. Friess, M. S. Kobrin, M. Buchler, H. G. Beger and M. Korc "Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness." *Anticancer Res* 1993; 13:(3); 565-9.
- Yeo, C. J. "Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy." *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7:(1); 143-56.
- Zhang, H. T., Q. Wang, M. I. Greene and R. Murali "New perspectives on anti-HER2/neu therapeutics." *Drug News Perspect* 2000; 13:(6); 325-9.
- Zhang, L. and S. Z. Yuan "Expression of c-erbB-2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and TGF-beta1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1:(4); 620-3.
- Zhang, W., D. J. Park, B. Lu, D. Y. Yang, M. Gordon, S. Groshen, J. Yun, O. A. Press, D. Vallbohmer, K. Rhodes and H. J. Lenz "Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation." *Clin Cancer Res* 2005; 11:(2 Pt 1); 600-5.
- Zidan, J., I. Dashkovsky, C. Stayerman, W. Basher, C. Cozacov and A. Hadary "Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease." *Br J Cancer* 2005; 93:(5); 552-6.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Ref.: carta datada de 21.01.09

Ao

Departamento de Gastroenterologia

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 15.04.09, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 0193/07, intitulado: "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", contempla o sub-projeto intitulado "Análise da expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGF-R) em pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a tratamento cirúrgico com intuito curativo", que será tese de Doutorado do Dr. Marcos Vinicius Perini, tendo como orientadora a Dr. André Luis Montagnini.

CAPPesq, 22 de abril de 2009

OK
Prof. Dr. Ivan Aeconello
 Diretor da Divisão de Clínica Cirúrgica II de HC
 Titular das Disciplinas de Cirurgia do Aparelho Digestivo
 e de Coloproctologia da FMUSP

Prof. Dr. Eduardo Massad
 Presidente da Comissão de
 Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
 Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
 Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
 Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
 sol

APÊNDICE 2

**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 Landman
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICE 3

Protocolo do Levantamento Retrospectivo dos Dados

- 1) Nome: _____ 2) RGH: _____ 3) AP: _____
- 4) Tipo de Cirurgia: () GDP () DPT () PCC () PT
- 5) Veia Porta: () sim () não 6) Data da Cirurgia: ____/____/____
- 7) Idade: _____ 8) Gênero: () 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) CA19-9: _____
- 17) Dor abdominal: () sim () não 18) Qto tempo: _____
- 19) ASA: () I () II () III () IV () indisponível
- 20) Local do tumor: _____ 21) Tamanho(cm): _____
- 22) Linf. comprometido: () sim () não 23) Linf Dissec: _____
- 24) Inv Vasc: () sim () não 25) Inv Neural: () sim () não
- 26) Inv Linfática: () sim () não 27) Congelação: () sim () não
- 28) Tempo cirúrgico: _____ 29) Transf. Sangue: () sim () não
- 30) Unidades de concentrado de hemáceas: _____
- 31) Diferenciação: () bem () moderado () pouco 32) T___ N___ M___
- 33) Estadio: _____
- 34) Expressão do EGFR na membrana
Tecido não tumoral	() negativo	() +1	() +2	() +3
Tecido tumoral	() negativo	() +1	() +2	() +3
Tecido metastático	() negativo	() +1	() +2	() +3
- 35) Expressão do EGFR no citoplasma celular
Tecido não tumoral	() 0	() +1	() +2	() +3
Tecido tumoral	() 0	() +1	() +2	() +3
Tecido metastático	() 0	() +1	() +2	() +3
- 36) Perman SNG: () sim () não 37) Realiment (dia de PO): _____
- 38) NPP: () sim () não 39) ATB: () sim () não
- 40) Complicações: () sim () não
- 41) Fístula Pancreática: () sim () não 42) Retardo Gástrico: () sim () não
- 43) Infecção: () sim () não 44) Sangramento: () sim () não
- 45) Alta PO: _____ 46) Data Alta: ____/____/____
- 47) Reoperação: () não () sim → causa _____

48) Data Reop: __/__/__

49) Óbito Hospitalar: () sim () não

50) Adjuvância: () sim () não

51) QT () sim () não

() 5-fu () Lucovorin () Genzar

() Outro: _____

Sessões: _____

Dose: _____

52) RDT () sim () não Dose: _____

53) QT e RDT: () sim () não

54) STATUS: () Morto pela Doença

() Vivo com a Doença

() Morto por Outras Causas

() Vivo sem a Doença

55) Data da Última Consulta/Contato: __/__/__

56) Data do Óbito: __/__/__

57) Telefone: _____

APÊNDICE 4

Gráfico 4- Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto ao sexo

APÊNDICE 5

Gráfico 5 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto a invasão vascular

APÊNDICE 6

Gráfico 6 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto a invasão neural

APÊNDICE 7

Gráfico 7 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto a ressecção venosa portal

APÊNDICE 8

Gráfico 8 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto a metástase linfonodal

APÊNDICE 9

Gráfico 9 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto a invasão do tecido peri-pancreático

APÊNDICE 10

Gráfico 10 - Sobrevida global cumulativa dos pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático submetidos a ressecção cirúrgica quanto ao comprometimento neoplásico da margem de ressecção

APÊNDICE 11

Sexo	1- masculino	2- feminino		
Raça	1- branca	2- negra	3- amarela	
Local do tumor	1- cabeça	2- corpo/cauda		
Cirurgia	1- gdp	2- dpt	3- pcc	4-pt
Ressecção veia porta	0- ausente	1- presente		
Diferenciação	1- bem	2- moderadamente	3-pouco	
Linfonodo	0- sem acom.	1- acometido		
Invasão vascular	0- ausente	1- presente		
Invasão neural	0- ausente	1- presente		
Veia porta patologia	0- ausente	1- presente		
Margem	0-livre	1-acometida		
Margem pancreática	0-livre	1-acometida		
Margem coledociana	0-livre	1-acometida		
Óbito pela doença	0- não	1- sim		
Expressão	0- ausente	1- presente		