

LUCIANA BERTOCCO DE PAIVA HADDAD

Expressão de marcadores imunoistoquímicos de origem
tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo
intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater

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: Prof. Dr. José Jukemura

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Haddad, Luciana Bertocco de Paiva

Expressão de marcadores imunoistoquímicos de origem tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater / Luciana Bertocco de Paiva Haddad. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: José Jukemura.

Descritores: 1.Ampola hepatopancreática 2.Adenocarcinoma 3.Imunoistoquímica
4.Cirurgia 5.Prognóstico

USP/FM/SBD-342/09

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*.

a minha mãe Maria Lúcia
por um amor sem medidas

ao meu pai Naief
meu caminho, meu espelho

aos meus irmão, Naief, Youssef e Mariana
grande alegria de minha vida

e a Wellington
amor da minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wellington Andraus, pela contribuição essencial para a elaboração desta tese, direta ou indiretamente, e pelo amor e companheirismo em todos os momentos

Ao Prof. Dr. José Jukemura, mestre e amigo, que diariamente me ensina a arte de ser médico, pela orientação sabia e confiança depositada.

À Dra. Rosely Patzina pela sua irrestrita colaboração e inestimável ajuda na análise dos estudos histológicos e demais etapas desta tese.

Ao Prof. Dr. Ivan Cecconello por incentivar a dedicação à pesquisa e abrir espaço para sua realização.

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado, pelos seus ensinamentos em minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Monteiro da Cunha, pelo apoio e confiança desde meu ingresso no grupo de Pâncreas e Vias Biliares, e pela contribuição no trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque pelo estímulo e apoio ao desenvolvimento do trabalho e à pesquisa.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, pela supervisão atenciosa na realização do trabalho de imunoistoquímica e pelo apoio.

À biomédica Neila Aparecida de Souza Silva, pela realização técnica das lâminas de estudo imunoistoquímicos, pelo empenho no auxílio de busca por fomentos e disponibilidade.

Ao Dr. Iberê Cauduro Soares, pelo preparação e construção do bloco de *tissue microarray*.

Aos amigos do Serviço de Cirurgia do Pâncreas e Vias Biliares, Dra. Sônia Penteado, Dr. Emilio Abdo, Dr. André Montagnini, Dr. André Siqueira Matheus, Dr. Marcos Perini e Dr. Emerson Abe pela amizade sincera, convivência harmoniosa, apoio irrestrito, compreensão e auxílio nos momentos de necessidade.

Ao estaticista Demerson Polli, pela revisão das análises estatísticas, pelas discussões matemáticas e médicas, pelo entusiasmo e disponibilidade.

Ao artista Marcos Antonio Retzer, pelas ilustrações e à bibliotecária Marta Rodrigues pelo auxílio no levantamento de artigos.

Às secretárias Vilma de Jesus Liberio, Mariza Ochner, Maria Cristina Rabello, Myrtes Freire de Lima Graça, Maria Joelice dos Reis Santos e Fabiana Renata Soares Bispo pelo carinho, disponibilidade e paciência.

Aos residentes da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo que com suas dúvidas e buscas pelo conhecimento nos estimulam a nos mantermos aprendizes.

Aos pacientes, meus profundos agradecimentos

E a todos que de uma maneira ou de outra colaboraram para a realização desta tese.

A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria sorte

Ernest Renan

CONTEÚDO

Conteúdo	7
Lista de abreviaturas e símbolos	9
Lista de Tabelas.....	13
Resumo	15
Summary.....	17
1. Introdução	2
1.1 Marcadores imunoistoquímicos relacionados a origem tecidual	5
1.1.1 Citoqueratinas.....	5
1.1.2 Mucinas.....	7
1.1.3 CDX2	11
1.1.4 CD10.....	14
1.2 Marcadores imunoistoquímicos relacionados à carcinogênese	15
1.2.1. p53	15
1.2.2. p16	17
1.2.3. Antígeno Ki67	17
1.2.4. CEA	18
1.2.5. CA19-9.....	19
1.2.6. Instabilidade de microssatélites (hMLH1, hMSH2 e hMSH6).....	20
1.3 Hipótese	21
2. Objetivos.....	23
3. Métodos.....	25
3.1 Casuística	25
3.2. Características Clínicas e Seguimento de Sobrevivência	26
3.3. Técnica Operatória.....	27
3.4. Estudo Histopatológico.....	28
3.5. <i>Tissue Microarray</i>	32
3.6. Imunoistoquímica	34
3.7. Análise dos Resultados de Imunoistoquímica	36
3.8. Estatística	39
4. Resultados	42
4.1 Características Clínicas.....	42

4.2. Características anatomopatológicas	44
4.3. Expressão imunoistoquímicos para diferenciação do epitélio de origem.....	46
4.4. Marcadores imunoistoquímicos de alterações genéticas	60
4.5. Instabilidade de Microsatélites.....	67
4.6. Expressão do CEA e CA 19-9	72
4.7. Análise da expressão dos marcadores relacionados à carcinogênese com o tipo histológico	74
4.8. Fatores associados à recidiva precoce ou longa sobrevivência livre de doença	75
4.9. Análise de Sobrevivência	77
5. Discussão	83
5.1. Casuística e método empregado	83
5.2. Discussão relativa aos resultados	83
5.2.1 Marcadores imunoistoquímicos para diferenciação do epitélio de origem.....	86
5.2.2 Marcadores imunoistoquímicos relacionados à carcinogênese....	93
6- Conclusões.....	103
7. Anexos	106
8. Referências	109
Apêndices	

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAV	adenocarcinoma da ampola de Vater
TI	tipo intestinal
TPB	tipo pancreatobiliar
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
TNM	tumor, linfonodo e metástase a distância
UICC	Union Internationale Contra le Cancer
H&E	hematoxilina e eosina
TMA	arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray)
CK7, CK17, CK20	citoqueratina basais
MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6	mucinas
p53	proteína p53
p16	proteína p16
MMR	proteínas de reparo do DNA (<i>mismatch repair</i>) hMLH1, hMSH2 e hMSH6
IMS	instabilidade de microssatélites
hMLH1	<i>Homo sapiens MutL homolog 1</i>
hMSH2	<i>Homo sapiens MutS homolog 2</i>

hMSH6	<i>Homo sapiens MutS homolog 6</i>
%	por cento
±	mais ou menos
+	positivo
-	negativo
400 x	aumento de quatrocentas vezes
g/dl	gramas por decilitro
mg/dl	miligramas por decilitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ampola de Vater e os diferente tipos de mucosa que podem originar neoplasia.....	3
Figura 2: Reconstrução em dupla alça para duodenopancreatectomia.....	28
Figura 3: Adenocarcinoma da ampola de Vater do tipo intestinal, com células de Paneth (H&E, 400x)	31
Figura 4: Adenocarcinoma da ampola de Vater do tipo pancreatobiliar, com atipia celular (H&E, 400x).....	31
Figura 5: Sistema de transferência de cortes histológicos por selos	33
Figura 6: Preparo do bloco de TMA	33
Figura 7: Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo positivo dos marcadores para o tipo intestinal	50
Figura 8: Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo positivo dos marcadores para o tipo pancreatobiliar	50
Figura 9: MUC2 – marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)	51
Figura 10: CK20 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)	51
Figura 11: CDX2 – marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)	51
Figura 12: CD10 – marcação imunoistoquímica com padrão de membrana em AAV tipo intestinal (400x)	52
Figura 13: MUC1 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo pancreatobiliar (400x).....	52
Figura 14: CK7 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático e de membrana em AAV tipo pancreatobiliar (400x)	52
Figura 15: Curva ROC.....	58
Figura 17: p16 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo pancreatobiliar (400x).....	66
Figura 18: Ki67 – marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV tipo pancreatobiliar (400x)	66
Figura 16: p53 - marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV, A tipo intestinal, B tipo pancreatobiliar (400x)	66

Figura 19: hMLH1 - marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV tipo intestinal (400x)	68
Figura 21: hMSH6 - marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV tipo pancreatobiliar (400x)	68
Figura 20: hMSH2 -marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV; A, positiva; B, negativa frente a controle de tecido não neoplásico positivo (400x) 68	
Figura 22: CEA - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)	73
Figura 23: CA19-9 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo pancreatobiliar (400x).....	73
Figura 24: Curva de sobrevivência em cinco anos em relação ao acometimento linfonodal.....	79
Figura 25: Curva de sobrevivência em cinco anos em relação ao estadiamento TNM	79
Figura 26: Curva de sobrevivência em cinco anos em relação à invasão linfática.....	80
Figura 27: Curva de sobrevivência em cinco anos em relação ao tipo histológico	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos anticorpos utilizados nas reações imunoistoquímicas	36
Tabela 2- Características clínico-cirúrgicas gerais.....	43
Tabela 3- Mortalidade e morbidade pós-operatória	44
Tabela 4- Características anátomo-patológicas	46
Tabela 5- Estadiamento e classificação TNM.....	46
Tabela 6- Positividade para marcadores imunoistoquímicos dos tumores tipo intestinal e pancreatobiliar	48
Tabela 7- Sensibilidade, especificidade e acurácia dos marcadores imunoistoquímicos para determinação do tipo histológico	49
Tabela 8- Modelo linear generalizado para identificar os principais marcadores imunoistoquímicos para determinação do tipo histológico	53
Tabela 9- Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores apontados como significantes para determinação do tipo histológico.....	54
Tabela 10- Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores MUC2 e CDX2 associados.....	54
Tabela 11- Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores MUC1, MUC2 e CDX2 associados.....	55
Tabela 12- Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores MUC1, CK7, MUC2 e CDX2 associados.....	55
Tabela 13- Marcadores imunoistoquímicos para os tumores tipos incomuns	57
Tabela 14- Análise da probabilidade de ser tipo pancreatobiliar dos tumores incomuns, segundo análise GLM	57
Tabela 15- Comparação da classificação histológica com a classificação imunoistoquímica dos AAV	59
Tabela 16- Relação entre imunoexpressão do p53 e características clínicas e anatomopatológicas.....	61
Tabela 17- Relação entre imunoexpressão do p16 e características clínicas e anatomopatológicas.....	63
Tabela 18- Relação entre imunoexpressão do Ki67 e características clínicas e anatomopatológicas.....	65

Tabela 19- Frequência das diversas possibilidades de perfis de expressão de proteínas MMR	67
Tabela 20- Relação entre expressão de hMLH1 e características clínicas e anatomopatológicas.....	69
Tabela 21- Relação entre expressão de hMSH2 e características clínicas e anatomopatológicas.....	70
Tabela 22- Relação entre expressão de hMSH6 e características clínicas e anatomopatológicas.....	71
Tabela 23- Relação entre a imunoexpressão do CEA e demais marcadores imunoistoquímicos.....	72
Tabela 24- Expressão dos marcadores relacionados à carcinogênese e o tipo histológico e classificação imunoistoquímica dos AAVs	74
Tabela 25- Comparação entre doentes com óbito após menos de 20 meses do tratamento cirúrgico e aqueles com sobrevivência maior que 120 meses, em relação aos critérios clínicos, anatomopatológicos e marcadores imunoistoquímicos.....	76
Tabela 26- Fatores relacionados à sobrevivência, em análise univariável	78
Tabela 27- Modelo de risco proporcional com cura	81

RESUMO

Haddad LBP. Expressão de marcadores imunoistoquímicos de origem tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 119p

INTRODUÇÃO: Os adenocarcinomas da ampola de Vater (AAV) são classificados conforme a diferenciação histológica em tipos pancreatobliliar e intestinal, com comportamento biológico e prognóstico diferentes. O objetivo deste estudo foi determinar um painel imuno-histoquímico para a diferenciação do tipo histológico dos AAVs e analisar os fatores relacionados com a sobrevivência desses tumores em uma série de pacientes submetidos à ressecção do tumor com intenção curativa. **MÉTODO:** Variáveis clínicas e histopatológicas foram analisadas para os tipos intestinal e pancreatobiliar em 97 doentes submetidos à ressecção pancreática por AAV. A expressão de mucinas (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6), citoqueratinas (CK7, CK17, CK20), CD10, CDX2, p53, p16, Ki67, CEA, CA19-9, hMLH1, hMLH2 e hMSH6 foi avaliada usando técnica de imunoistoquímica. **RESULTADOS:** Quarenta e três casos foram histologicamente classificados como tipo intestinal, 47 como tipo pancreatobiliar e 7 em outros tipos, de acordo com a classificação de Albores-Saavedra. O tipo intestinal apresentou expressão significativamente maior de MUC2 (74,4% vs 23,4%; $p < 0,001$), CK20 (76,7% vs 29,8%; $p < 0,001$), CDX2 (86% vs 21,3%; $p < 0,001$) e CD10 (81,4% vs 51,1%; $p = 0,002$); enquanto MUC1 (53,5% vs 82,9%; $p = 0,001$) e CK7 (79,1% vs 95,7%; $p = 0,041$) foram mais expressos nos adenocarcinomas pancreatobiliares. Os marcadores imunoistoquímicos com maior acurácia para determinação do tipo histológico foram CDX2, MUC2 e CK20 (82,2%, 75,5% e 73,3% respectivamente). A positividade para p53, p16, Ki67, CEA e CA19-9 foram 36,1%, 30,9%, 37,1%, 79,4% e 88,6%, respectivamente, sem qualquer diferença significativa entre os tipos intestinal e pancreatobiliar. A perda de expressão de pelo menos uma das proteínas hMLH1, hMLH2 e hMSH6 ocorreu em 13,4%, sem diferença entre os tipos histológicos. Em análise univariada, a sobrevivência foi significativamente menor para o tipo histológico pancreaticobiliar ($p = 0,021$), estadiamentos TNM mais avançados ($p < 0,001$), neoplasias com acometimento linfonodal ($p < 0,001$) e invasão linfática ($p = 0,004$). Em análise multivariada, o acometimento linfonodal ($p < 0,001$) e a invasão linfática (0,013) foram fatores independentes de risco. **CONCLUSÃO:** A expressão imunoistoquímica de MUC1, MUC2 e CDX2 são úteis para a classificação dos AAVs em tipo intestinal e pancreatobiliar. O tipo intestinal esteve associado a um melhor prognóstico, mas apenas o acometimento linfonodal e a invasão linfática foram fatores independentes de risco.

Descritores: 1. Ampola hepatopancreática, 2. Adenocarcinoma, 3. Imunoistoquímica, 4. Cirurgia, 5. Prognóstico.

SUMMARY

Haddad LBP. Immunohistochemistry expression of tissue origin and carcinogenesis markers in adenocarcinomas of intestinal and pancreaticobiliary types of Vater's ampolla [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 119p

The intestinal and pancreatobiliary types of histological Vater's ampulla adenocarcinoma present different biologic behavior and prognosis. The aim of the present study was to determine the best immunohistochemical panel for tumor classification and analyze the survival of these histological types in a series of patients. Clinical and histopathological variables were analyzed for each pancreatobiliary and intestinal type differentiation in 97 resected ampullary adenocarcinomas. The expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6), cytokeratins (CK7, CK17, CK20), CD10, CDX2, p53, p16, Ki67, CEA, CA19-9, hMLH1, hMLH2 and hMSH6 was evaluated by using immunohistochemistry. Forty three Vater's ampulla carcinomas were histologically classified into intestinal type, 47 into pancreatobiliary type and 7 into other types, according to Albores-Saavedra classification. The intestinal type had a significantly higher expression of MUC2 (74.4%vs23.4%. $p<0.001$), CK20 (76.7%vs29.8% $p<0.001$), CDX2 (86%vs21. 3%. $p<0.001$) and CD10 (81.4%vs51.1%. $p=0.002$); while MUC1 (53.5%vs82.9%. $p=0.001$) and CK7 (79.1%vs95.7%. $p=0.041$) were higher in pancreatobiliary adenocarcinomas. The most accurate markers for the immunohistochemical classification were CDX2, MUC2 and CK20 (82.2%. 75.5% and 73.3% respectively). The positivity of p53, p16, Ki67, CEA and CA19-9 were 36.1%, 30.6%, 37.1%, 79% and 88%, respectively without any significant difference between intestinal and pancreatobiliary types. Loss of hMLH1, hMLH2 and hMSH6 proteins expression occurred in 13.4% of Vater's adenocarcinoma, without difference between intestinal and pancreaticobiliary types. Survival was significantly affected by pancreatobiliary type ($p=0.021$), tumor grade ($p<0.001$), nodal status ($p<0.001$) and lymphatic invasion ($p=0.004$). Only regional lymph node involvement ($p<0.001$) and lymphatic invasion ($p=0.013$) was independent risk factors for survival in a multivariate analysis. In conclusion, the immunohistochemical expression of apomucins MUC1, MUC2 and CDX2 are useful for the classification of ampullary adenocarcinoma in intestinal and pancreaticobiliary types. Intestinal type was associated with a better prognosis, but only lymph node status and lymphatic invasion were independent risk factors.

Keywords: 1. Hepatopancreatic ampulla, 2. Adenocarcinoma, 3. Immunohistochemistry, 4. Surgery, 5. Prognosis.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A ampola de Vater é formada pela união do ducto biliar comum e do ducto pancreático principal em sua desembocadura, na parede póstero-medial da segunda porção duodenal. É uma estrutura anatômica complexa, composta por fibras musculares e elementos neuronais especiais que regulam, através do esfíncter de Oddi, o fluxo de bile e suco pancreático para o trato digestivo (1, 2).

Os componentes da ampola de Vater são a papila duodenal maior, o canal comum, a porção distal do colédoco e a porção distal do ducto pancreático principal. A papila duodenal é uma projeção de mucosa do tipo intestinal através da parede duodenal (3). As demais partes da ampola são revestidas por epitélio simples mucinoso, como dos ductos pancreaticobiliares (4). Conseqüentemente, os tumores ampulares podem se originar de 2 tipos diferentes de epitélio, o que pode refletir em diferentes espectros histomorfológicos destes tumores (5) (Figura 1).

As neoplasias originadas da ampola de Vater são raras. Sua incidência é estimada em 5 a 7 casos por milhão de habitantes ao ano (6). Representam 0,2% das neoplasias do trato gastrointestinal (7) e 7 a 12% dos tumores periampulares (8). É a segunda neoplasia mais frequente da região periampular, após os tumores do pâncreas (9). Apesar de pouco comuns, a ocorrência de adenomas e carcinomas nesta localização é mais frequente que em todo o intestino delgado (10). Isto ocorre provavelmente devido a exposição permanente da mucosa da ampola às secreções do fígado, vesícula biliar, pâncreas e duodeno (10). O epitélio da ampola possui

elementos protetores para essa agressão, como a secreção de muco, além de mecanismos de prevenção do refluxo do duodeno para o ducto pancreático e ducto biliar (11). A perda de fatores protetores pode estar relacionada com a carcinogênese dos adenocarcinomas da ampola de Vater (AAVs).

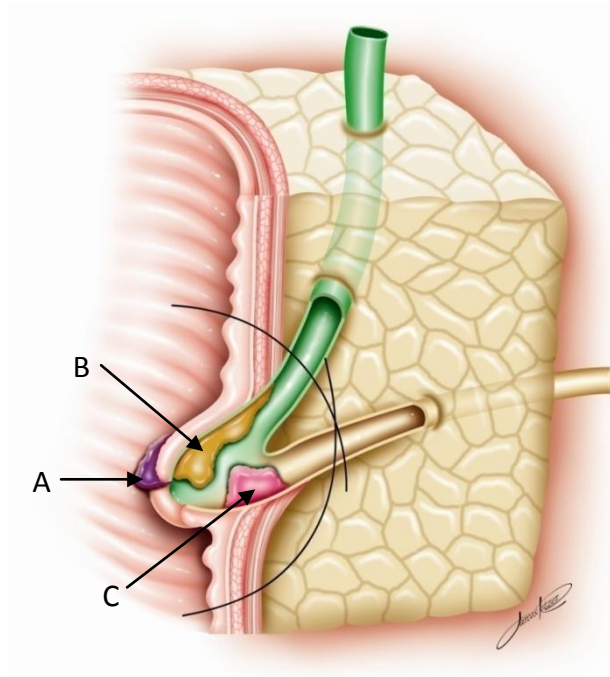


Figura 1: Ampola de Vater e os diferente tipos de mucosa que podem originar neoplasia. A; mucosa tipo intestinal, B; epitélio simples mucinoso biliar, C; epitélio simples mucinoso pancreático

Os pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater (AAV) apresentam manifestações clínicas mais precoces e maior índice de ressecabilidade quando comparados aos demais tumores periampulares(12). A sobrevivência após ressecção é maior que do adenocarcinoma de pâncreas e vias biliares, porém pior que do adenocarcinoma de duodeno (12-18)

Estudos histopatológicos recentes começaram a elucidar a patogênese dos cânceres da ampola de Vater. Kimura *et al* (19) foram os primeiros a diferenciar os tipos pancreatobiliar (TPB) e intestinal (TI) para os tumores ampulares. Albores-Saavedra (20) classificou os tumores ampulares em 2 tipos principais, pancreatobiliar e intestinal; e tipos “incomuns”, como os carcinomas com células em anel de sinete e os carcinomas indiferenciados. Baseados na classificação de Albores-Saavedra, uma série de estudos moleculares analisaram a histogênese e tumorigênese dos carcinomas ampulares.

O tratamento com intenção curativa dos AAVs é a duodenopancreatectomia ou gastroduodenopancreatectomia, ambas as operações apresentando resultados de sobrevivência semelhantes(21-23). Estas operações cirúrgicas, inicialmente descritas com alta morbimortalidade, atualmente apresentam índices de mortalidade operatória de 1,5 a 2,5% nos centros especializados, porém ainda com altos índices de complicações pós-operatórias (9, 24).

Os fatores mais frequentemente relacionados à melhor sobrevivência nos pacientes com tumores da ampola de Vater são: a ressecabilidade com margens livres e ausência de linfonodos acometidos. Outros fatores como tamanho do tumor, grau de diferenciação histológica, estadiamento TNM, invasão neural e tipo histológico apresentam influência variável entre os diversos estudos (6, 12, 13, 25-31)

Estudos iniciais sugerem que o carcinoma de ampola de Vater do tipo intestinal está associado a melhor prognóstico que o tipo pancreatobiliar (32-35).

Entretanto, apresentam resultados muitas vezes conflitantes, talvez pelo fato de não haver até o momento um critério histomorfológico consistente e confiável para fazer este diagnóstico diferencial (19, 20, 32).

1.1 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS RELACIONADOS A ORIGEM TECIDUAL

A origem tecidual dos adenocarcinomas ampulares nem sempre pode ser determinada apenas com os aspectos histológicos, principalmente para patologistas pouco familiarizados com esses tumores (33). Atualmente, não há marcador imunoistoquímico capaz de distinguir inequivocamente os tumores da ampola de Vater de origem intestinal daqueles de origem pancreatobiliar. Assim, faz-se necessário compor um painel de marcadores com maior precisão para esse fim.

Caracterização dos antígenos

1.1.1 Citoqueratinas

As citoqueratinas foram os primeiros marcadores imunoistoquímicos testados para tumores periampulares. São proteínas de filamentos intermediários entre microfilamentos e microtúbulos, que constituem o citoesqueleto de células

epiteliais eucarióticas, sendo marcadores amplamente utilizados. Embora geralmente confinados aos epitélios e suas respectivas neoplasias, não são marcadores com alta especificidade, pois aparecem em diferentes tipos de tumores (36).

As citoqueratinas correlacionam-se com diferentes vias de diferenciação epitelial e origem embrionária, permitindo a classificação das células epiteliais em diferentes subtipos. Esta expressão é mantida mesmo durante o processo de transformação tumoral (37). As citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) são as duas mais comumente utilizadas na prática da patologia cirúrgica (36, 38, 39).

Chu *et al* analisaram a expressão de citoqueratinas em tecidos não tumorais e verificaram que o CK7 está expresso nas células de ductos biliares e pancreáticos e essencialmente ausente no epitélio gastrointestinal, e o CK20 está expresso no epitélio gástrico foveolar, nos vilos intestinais e no epitélio das criptas (40).

Para determinar a expressão de citoqueratinas nos tumores de origem pancreática, Vang *et al* estudaram uma centena de casos e verificaram que os cistoadenomas mucinosos pancreáticos expressam CK7 na totalidade dos casos, e CK20 na metade deles (41). A neoplasia intraductal papilífera mucinosa também expressa CK7, porém a expressão do CK20 é pouco frequente, em menos de 20% casos (41). Os adenocarcinomas pancreáticos e biliares apresentam expressão difusa para CK7; entretanto a expressão de CK20 é variável, desde negativo, ou positividade focal e até multifocal (42, 43).

Os estudos relativos à ampola de Vater são mais recentes, como de Zhou *et al* (32), que verificaram que nos tecidos normais há expressão do CK7 no canal comum, glândulas periampulares da ampola, e também no ducto pancreático. O CK20, ao contrário, está expresso no epitélio da superfície duodenal e na papila duodenal.

A citoqueratina 17 é uma queratina de baixo peso molecular e pertence à família das citoqueratinas tipo 1 (37). Está expressa nos tecidos normais apenas em células basais e mioepiteliais; (40) e nos carcinomas de células escamosas, basais e transicionais ou adenocarcinomas com diferenciação escamosa (37). Estudando a expressão do CK17 em uma série de adenocarcinomas, Miettinen *et al* encontraram uma frequência de positividade de 90% em pâncreas e 50% em colangiocarcinomas (44). Chu *et al* verificaram a expressão de CK17 em 83% dos adenocarcinomas pancreáticos e dos AAV do tipo pancreatobiliar; já para os AAV tipo intestinal houve apenas 18% de expressão desta citoqueratina (3).

1.1.2 Mucinas

Um grande avanço para diagnóstico da origem tecidual para diversas neoplasias se deu com a descoberta das mucinas. As mucinas são glicoproteínas filamentosas presentes na interface das células e seu micro-ambiente extracelular, podendo ser secretadas para o lúmen de órgãos com cavitários formando camadas de muco, ou participar de funções celulares como proteínas de membrana (45, 46).

Atualmente 14 glicoproteínas do tipo mucina estão catalogadas na família do gene MUC (MUC1, 2, 3A, 3B, 4, 5AB, 5AC, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15) conforme o *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* (47, 48). Originalmente o termo mucina era utilizado para glicoproteínas encontradas no muco secretado pelos enterócitos do trato gastrointestinal, posteriormente, evidenciou-se a produção de glicoproteínas que atuam como proteínas transmembrana nas células epiteliais, com função de mediação de interações entre as células e seu microambiente, e que também foram designadas mucinas. Dessa forma, as mucinas podem estar no centro da patogênese de várias doenças inflamatórias, infecciosas e também de neoplasias e suas metástases (46, 48).

As mucinas são classificadas como de membrana ou secretora, e incluídas nas famílias do gene MUC de acordo com a localização cromossômica. A primeira família de mucinas é a secretora. Esta família é composta pelo MUC2, MUC5AC, MUC5AB e MUC6; são formadores de muco e são codificadas pelo gene localizado no cromossomo 11p15. A segunda família é formada pelas mucinas de membrana. Esta família é composta pelas mucinas MUC3A, MUC3B, MUC11 e MUC12 e o gene que as codifica localizada-se no cromossomo 3q13.3. A MUC1, cujo gene localiza-se no cromossomo 1q21, também é uma proteína de membrana, sendo agrupada nesta família. Ainda não se identificou homologia genética para as mucinas MUC7 e MUC8, portando, elas não estão inclusas em nenhuma das famílias (46).

A MUC1, também conhecido como mucina pan-epitelial associada à membrana, tem ampla distribuição no corpo humano. Está presente em glândulas

mamárias, ductos pancreáticos e superfície foveolar gástrica. A MUC2, mucina secretória intestinal, é expressa em células caliciformes e tumores do trato gastrointestinal inferior. A MUC5AC, mucina gástrica secretória de célula foveolar, e a MUC6, mucina gástrica secretória de glândulas pilóricas, são consideradas as principais mucinas que caracterizam a mucosa gástrica (45, 49).

Corfield *et al* (50) descreveram a distribuição das mucinas no trato gastrointestinal normal. A MUC1 está presente nos ácinos de glândulas salivares, ductos das glândulas submucosas esofágicas, ductos pancreáticos, epitélio foveolar superficial gástrico, nas células caliciformes e enterócitos dos intestinos delgado e grosso. As MUC2, MUC5AC e MUC6 são todas formadoras de gel, responsáveis pela formação das camadas de muco no corpo. A MUC2 é expressa nas células caliciformes dos intestinos delgado e grosso. A MUC5AC é expressa no epitélio foveolar gástrico. A MUC6 é a principal mucina gástrica.

Lee *et al* (45) estudaram 486 casos de carcinomas de diversos sítios anatômicos do trato gastrointestinal, avaliando entre outros marcadores, as mucinas MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6. A MUC1 foi expressa mais frequentemente nos carcinomas de pâncreas, do ânus e da vesícula biliar. A MUC2 foi frequentemente positiva nos carcinomas de intestino delgado e de cólon, bem como na totalidade dos carcinomas do apêndice cecal. A MUC5AC foi positiva em cerca de 70% dos carcinomas de pâncreas e de apêndice cecal. A MUC6 não foi expressa nos casos estudados. Observaram ainda que a MUC1 ajuda a distinguir os carcinomas de cólon dos carcinomas de ânus; e que o padrão de positividade da

MUC1, MUC2 e CK20 é diferente nos carcinomas de duodeno e nos carcinomas do resto do intestino delgado, sendo MUC1+/MUC2-/CK20- no duodeno e MUC1-/MUC2+/CK20+ no jejuno e íleo.

A expressão de mucinas foi estudada no pâncreas normal e em diversos tumores pancreáticos por Terada *et al* (51). O pâncreas normal expressou MUC1, tanto nos ductos quanto nos ácinos, já a MUC2, MUC3 e MUC5/6 não foram expressas em nenhuma célula. Na pancreatite crônica, a MUC1 foi expressa na maioria dos casos, e 40% deles expressaram MUC5/6. Na neoplasia intraductal papilífera mucinosa houve expressão frequente de MUC1 e MUC5/6, e metade dos casos expressaram MUC3. Finalmente, no adenocarcinoma ductal invasivo houve expressão em quase a totalidade dos casos de MUC1, MUC3 e MUC5/6 (51).

Assim, a MUC1 pode ser considerada apomucina do pâncreas normal, persistindo durante a transformação neoplásica. No pâncreas normal a expressão é apical ou membranosa, diferente do adenocarcinoma, onde há uma expressão citoplasmática difusa (52).

No adenocarcinoma pancreático ductal, além da hiperexpressão de MUC1, verifica-se expressão de MUC6 e MUC5AC, sugerindo presença de metaplasia foveolar gástrica e metaplasia pilórica em fases precoces da carcinogênese, desde os estágios iniciais de neoplasia pancreática intraepitelial (PanIN) até o carcinoma ductal invasivo. Entretanto, a metaplasia intestinal evidenciada pela expressão de MUC2 raramente ocorre (49, 51, 53-56).

A expressão de mucinas é útil também na caracterização dos cistoadenomas mucinosos e dos adenomas intraductais papilíferos mucinosos (IPMA) do pâncreas. Enquanto o primeiro expressa MUC1, MUC2 e MUC5AC em cerca de um terço dos casos; nos IPMAs a expressão da MUC1 é pouco freqüente, e quase sempre ocorre expressão do MUC5AC e da MUC2 (41, 52).

O uso de um painel de mucinas composto por MUC1, MUC2 e MUC5AC serve para o diagnóstico diferencial de lesões pancreáticas, inclusive à partir de material de biópsias (52).

A expressão de mucinas na ampola de Vater foi estudada em espécimes de cadáveres de indivíduos sem histórico de doença gastrointestinal, comparando com a mucosa duodenal (57). Utilizando análise de mRNA, tanto a ampola de Vater quanto o duodeno normais expressaram MUC1, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC6 e MUC7; já MUC2 e MUC8 foram expressos apenas na mucosa duodenal. Em estudo imunoistoquímico, a ampola de Vater e o duodeno expressaram MUC4, MUC5AC e MUC6 e no duodeno houve expressão de MUC2, MUC7 e MUC8. Assim, essas seriam as mucinas úteis para diferenciação da origem dos carcinomas ampulares.

1.1.3 CDX2

Um avanço significativo na identificação dos tumores de origem intestinal ocorreu com a identificação do gene CDX2. Ele é responsável pela transcrição de um fator intestinal específico e regula a expressão de MUC2 (58-60). A proteína CDX2

regula o desenvolvimento e a diferenciação do intestino delgado e grosso e é expressa no núcleo das células epiteliais de todo o trato intestinal na vida embrionária e pós-natal (59).

O papel deste fator de transcrição na carcinogênese intestinal é complexo e ainda controverso. Estudos bloqueando esse gene em ratos mostraram que a ausência do gene (-/-) é letal ainda na vida intra-uterina e nos heterozigotos (+/-) há desenvolvimento de hamartomas e neoplasias colônicas (61-63). Alguns estudos verificaram a perda de expressão do CDX2 em adenocarcinomas colorretais, com incidência variando de 2 a 10% dos casos (64-66). Tanto em estudo experimental com linhagens de câncer colorretal (67) quanto na análise de espécimes ressecados de humanos, (68) ficou demonstrado que a perda de expressão do CDX2 está associada aos adenocarcinomas colorretais pouco diferenciados.

No epitélio gástrico, a expressão do CDX2 está associada a uma expressão da mucina intestinal MUC2 e à presença de metaplasia do tipo intestinal (69). Em carcinomas gástricos o CDX2 está expresso em 55% dos casos, principalmente em tumores com morfologia intestinal (70). Além disso, o CDX2 é encontrado na metaplasia intestinal no esôfago de Barrett, conhecido precursor de adenocarcionoma esofágico (71).

No pâncreas normal, o CDX2 está presente nas células não beta das ilhotas de Langerhans, onde participa da regulação da produção de glucagon (72); e também é detectado em pequena quantidade nos ductos pancreáticos e células acinares (73). Na ampola de Vater verifica-se a expressão do CDX2 na mucosa

duodenal, porém não há expressão no epitélio do canal comum e dos ductos biliares e pancreáticos (74).

Werling *et al* (73) realizaram um grande estudo com 476 amostras de carcinomas de diversas localizações para determinar a expressão imunoistoquímica do CDX2. Verificaram que o CDX2 foi expresso de forma uniforme na maioria dos tumores de cólon e duodeno. Uma grande expressão foi verificada também em carcinomas mucinosos de ovário e adenocarcinoma primário da bexiga. Carcinomas gástricos, esofágicos, pancreáticos e de vias biliares mostraram um padrão heterogêneo de expressão, a maioria com pequeno número de células coradas. Carcinomas hepatocelulares e carcinóides gastrointestinais não expressaram CDX2, assim como carcinomas genitourinários, de pulmão, coração e pescoço. Concluíram que o CDX2 é o marcador com maior sensibilidade e especificidade para tumores de origem intestinal.

Alguns autores sugeriram que a análise da expressão imunoistoquímica do CDX2 pode ser útil para identificar carcinomas de origem intestinal, principalmente nos casos de metástases com sítio primário não determinado, com sensibilidade e especificidade maiores que 90% (73, 75).

Mais recentemente, Hansel *et al* (74) verificaram a expressão do CDX2 em 40% dos adenocarcinomas da ampola de Vater, sendo este um fator independente de melhor prognóstico. O CDX2 não é expresso no tecido normal das vias biliares, já nos adenocarcinomas, o CDX2 foi expresso em 16% a 42% dos casos, sendo a expressão um fator independente de melhor sobrevivência (60, 76).

1.1.4 CD10

O CD10 é também conhecido como CALLA (antígeno da leucemia linfoblástica aguda comum), uma metaloproteína de 100Kd da superfície celular envolvida na modulação das respostas celulares a hormônios peptídeos, idêntica à enzima endopeptidase neutra. É expresso por muitos tipos celulares, incluindo algumas linhagens de células epiteliais, assim como células hematopoiéticas, tais como linfócitos e granulócitos (77, 78). O CD10 reduz a resposta celular aos hormônios peptídeos e provavelmente está envolvido na proliferação celular mediada por peptídeos, além de controlar a atividade secretória do intestino através de mecanismos endócrinos e parácrinos (79).

A função biológica do CD10 parece ser órgão específica. No pulmão, ele regula o efeito das taquicinas; no rim, regula a ação do hormônio natriurético (80). A perda de expressão do CD10 ocorre em uma série de neoplasias, incluindo câncer renal, gástrico e próstata. Especula-se que a redução de CD10 promova uma proliferação celular mediada por peptídeos devido a um acúmulo importante destes na superfície celular, facilitando o desenvolvimento de neoplasias (80).

O CD10 está expresso na borda em escova das células da mucosa intestinal e nas células dos ductos pancreáticos (81). No pâncreas normal, mais de 80% das células expressam CD10 (41). Nos cistoadenomas mucinosos do pâncreas a expressão ocorre em 70% dos casos (41, 81), nos carcinomas neuroendócrinos pancreáticos em 50% (81), e nos IPMN não há expressão (41). No adenocarcinoma

ductal pancreático a expressão de CD10 é heterogênea e ocorre quase na totalidade dos casos (80).

Não há até o momento nenhum estudo publicado que tenha analisado a expressão do CD10 em AAV.

1.2 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS RELACIONADOS À CARCINOGENESE

Considerando as diferentes origens histológicas dos AAVS é provável que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desses tumores sejam diferentes. A utilização de marcadores imunoistoquímicos relacionados à carcinogênese pode de alguma maneira contribuir para a caracterização dos diferentes tipos de AAV.

1.2.1. p53

O gene supressor de tumor p53, localizado na banda 13.1 do braço curto do cromossomo 17, é o mais comumente implicado na carcinogênese humana, estando mutado em aproximadamente 50% de todas as neoplasias malignas (82, 83). Em seres humanos, a proteína p53 selvagem codificada por esse gene inibe a proliferação e a transformação celular nas células que apresentam dano no DNA, atuando quando a célula permanece em repouso (fase G1). Além de exercer papel importante na regulação celular, a alteração do p53 tem apresentado implicações

na síntese e na reparação do DNA, na manutenção da estabilidade genômica, na diferenciação celular e na apoptose (84). Em aproximadamente 80% dos casos, a mutação do p53 ocorre nos exons 5 – 8, sendo “missense”, ou seja, conduz para a substituição de um aminoácido, assim alterando a conformação da proteína (85, 86).

A proteína p53 é uma fosfoproteína de 53 kD que está presente no núcleo de células normais. No entanto, devido à meia-vida curta da proteína p53 do tipo selvagem, em torno de 20 minutos, esta normalmente não é detectada. Mutações de p53 frequentemente aumentam a estabilidade da proteína e, portanto, sua vida média, resultando na possibilidade de caracterização por imunistoquímica utilizando anticorpos monoclonais anti-p53 (87, 88).

O método de detecção da mutação do p53 por imunistoquímica tem resultados concordantes com a análise sequencial direta na maioria dos casos, e apenas uma pequena parcela de reações positivas à imunistoquímica se devem a outros mecanismos de estabilização da proteína (89).

A mutação do p53 é detectada em 50 à 70% dos adenocarcinomas pancreáticos (90, 91). Raramente essa mutação é encontrada nos casos de displasia, e nunca na hiperplasia (92), confirmando tratar-se de um fenômeno tardio na tumorigênese. Este marcador pode ser útil para diferenciar tumores bem diferenciados de displasia intensa.

No AAV a ocorrência de mutação do p53 é menos frequente, variando entre 13% e 46%, e parece ocorrer principalmente durante a transformação maligna de adenoma em carcinoma (93-97).

1.2.2. p16

No ciclo celular normal, a proteína p16 se liga ao complexo ciclina D-CDK4 ou 6, finalizando os processos do “ponto de checagem” G1-S do ciclo celular (98). Anormalidades na expressão do p16 predisõem uma progressão anormal do ciclo celular. Esta proteína é um produto do gene quinase dependente de ciclina 2 (CDKN2), também conhecido como gene supressor tumoral múltiplo número 1 (MTS1), localizado no cromossomo 9p21. É frequente a ocorrência de anormalidades nesse gene em neoplasias humanas como melanoma, leucemias, linfomas, carcinomas de esôfago, pulmão e cabeça e pescoço (99).

A inativação do gene p16 é extremamente frequente no câncer do pâncreas, ocorrendo em quase 100% dos casos (100). Alterações nesse gene também foram verificadas em 61,8% dos carcinomas de vesícula biliar, 54,5% dos colangiocarcinomas e 70,6% dos carcinomas ampulares (101).

1.2.3. Antígeno Ki67

O Ki67 é um antígeno nuclear presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, porém ausente na fase de repouso (G0). Pode ser detectado nas células em proliferação através do uso de anticorpos monoclonais (MIB-1 e MIB-3) pelo

método da imunoistoquímica e pode ser considerado um marcador de proliferação celular (83, 102).

O anticorpo anti-Ki67 MIB1 reconhece duas proteínas com pesos moleculares de 345 e 395kD, que são produto de um gene localizado na banda 25 do braço longo do cromossomo 10. Alguns estudos demonstram que a frequência de positividade do Ki67 é valioso parâmetro para caracterização de tumores malignos (103, 104). Acredita-se que, com a ajuda deste anticorpo monoclonal, é possível a rápida e simples determinação da fração de crescimento celular.

No câncer do pâncreas, o Ki67 é detectado com frequência elevada, sendo que há uma progressão de seus índices partindo da ausência no tecido pancreático normal, com aumento progressivo na hiperplasia ductal, displasia e carcinoma (92).

1.2.4. CEA

O antígeno carcinoma embrionário (CEA) é uma glicoproteína localizada na superfície apical dos enterócitos maduros e secretada na superfície luminal do trato gastrointestinal. O CEA é codificado por uma família de 29 genes localizados no cromossomo 19q13;2, dos quais 18 são expressos (105). Sua principal função no indivíduo normal está relacionado à adesão celular. Além do cólon, o CEA está presente no estômago, língua, esôfago, cérvix e próstata. Trata-se de um importante marcador tumoral para diversos carcinomas, principalmente os colorretais. É útil como marcador prognóstico, no estadiamento, avaliação de

recorrência e resposta ao tratamento destas e outras neoplasias. Pode ser diagnosticado nos tecidos através de imunoistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais (106).

1.2.5. CA19-9

O CA19-9 é uma glicoproteína que contém o antígeno Sialyl Lewis, usualmente positiva nos carcinomas de pâncreas, vias biliares e colorretais. Esse antígeno é sintetizado por uma série de glicosiltransferases. Há evidências de que ele é responsável pela adesão das células cancerígenas ao endotélio (107). O CA19-9 pode ser detectado por imunoistoquímica nos tecidos e já foi demonstrado correlação entre o grau de expressão tecidual e os níveis séricos desse antígeno em pacientes com câncer pancreático (108, 109).

Em pacientes com carcinoma pancreático avançado, os níveis séricos de CA19-9 pré-tratamento têm valor prognóstico em relação à sobrevivência e é útil para avaliação de resposta à terapêutica quimioterápica (110). Porém, esse não é um marcador sensível para diagnóstico de câncer do pâncreas em pacientes assintomáticos uma vez que pode elevar-se em doenças não neoplásicas, como nas icterícias de outras etiologias (111).

1.2.6. Instabilidade de microssatélites (hMLH1, hMSH2 e hMSH6)

A instabilidade de microssatélites (IMS) é um dos eventos mais importantes para o acúmulo de mudanças gênicas que ocasionam a predisposição à carcinogênese humana (112). Microssatélites são regiões genômicas com sequências de DNA curtas de repetições de nucleotídeos, existindo normalmente centenas de milhares destas no genoma humano (113). Durante a replicação de DNA, podem ocorrer mutações em algumas destas regiões resultando na contração ou alongamento do microssatélite conhecida como instabilidade de microssatélites (112).

Geralmente estas anormalidades são corrigidas durante a replicação celular por proteínas de reparo ou “mismatch-repair” (MMR). A observação de um grande número de alterações nas sequências de microssatélites está relacionada a uma deficiência na ação das proteínas de reparo causada por mutações (114).

A instabilidade de microssatélites foi primariamente descrita em pacientes com câncer colorretal hereditário não polipóide (HNPCC), apresentando mutações na linhagem germinativa em genes de reparo de DNA, que são o hMSH2, hMLH1, e hMSH6 (115, 116).

Poucos estudos analisaram o papel dessas proteínas de reparo do DNA nos adenocarcinomas da ampola de Vater. A frequência da incidência de instabilidade de microssatélites nesses estudos foi bastante variável (117-120). Park *et al* não detectaram nenhum caso de IMS na sua análise de 35 casos de ampolas de Vater normais, 22 adenomas e 32 carcinomas (118). A maior série, descrita por Sessa *et*

al, com 53 casos de AAV, encontrou uma frequência de 9,5% de IMS (120). Todos os casos tratavam-se de adenocarcinomas do tipo intestinal, e houve uma melhor sobrevivência desses doentes. Scarpa *et al* (119) encontraram 15% de IMS em sua série, também relacionados com melhor sobrevivência em 5 anos.

1.3 HIPÓTESE

Os adenocarcinomas da ampola de Vater tipo intestinal e pancreatobiliar devem expressar de forma diferente os marcadores teciduais de origem tecidual e os marcadores relacionados à diferenciação tumoral e instabilidade de microssatélites.

Além disso, como o tipo histológico influencia a evolução dos doentes após o tratamento cirúrgico curativo, esses marcadores podem influir na sobrevivência desses doentes.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

2.1- Realizar um painel imunoistoquímico capaz de determinar a origem tecidual dos adenocarcinomas da ampola de Vater.

2.2- Avaliar a frequência e associação com parâmetros clínicos e anatomopatológicos da expressão imunoistoquímica de marcadores relacionados à carcinogênese (proteína p53, p16, Ki-67, CEA, CA19-9, hMLH1, hMSH2 e hMSH6)

2.3- Analisar a diferença da expressão de marcadores relacionados à carcinogênese nos adenocarcinomas da ampola de Vater do tipo intestinal e pancreatobiliar.

2.4- Avaliar a influência de variáveis anatomopatológicas e dos marcadores imunoistoquímicos na sobrevivência dos doentes tratados cirurgicamente por adenocarcinoma da ampola de Vater

3 Métodos

3. MÉTODOS

O presente estudo teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp, protocolo de pesquisa n° 114/06) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O projeto foi financiado com Auxílio Pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (protocolo 2007/04735-4).

3.1 Casuística

Em etapa preliminar, foram investigados todos os 103 pacientes com diagnóstico de carcinoma de ampola de Vater tratados cirurgicamente com intenção curativa no Serviço de Vias Biliares e Pâncreas da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) entre 1985 e 2006. Somente os pacientes dos quais se obtiveram as lâminas e os blocos de parafina do tumor na Divisão de Anatomia Patológica deste Hospital foram incluídos, totalizando 97 doentes.

Os pacientes operados entre 1985 e 2003 foram estudados de maneira retrospectiva e aqueles operados a partir de 2003 foram seguidos prospectivamente através do banco de dados informatizado do serviço.

O adenocarcinoma ampular foi definido como aquele originado microscopicamente da ampola de Vater. Grandes tumores envolvendo o pâncreas, as vias biliares e/ou o duodeno foram tratados como ampulares quando centrados na ampola de Vater, sendo a definição dada pelo patologista. Outros tumores periampulares de origem biliar, duodenal ou pancreática foram excluídos, assim como os tumores não adenocarcinomas, como por exemplo os neuroendócrinos.

3.2. Características Clínicas e Seguimento de Sobrevida

Os dados de anamnese, exame físico, descrição cirúrgica, achados intra-operatórios, evolução pós-operatória e seguimento foram obtidos a partir da revisão dos prontuários no Serviço de Arquivo do HCFMUSP. A partir do ano de 2003 todos os doentes foram seguidos prospectivamente, com preenchimento sistemático destas informações em base de dados durante a hospitalização. Os resultados de exames laboratoriais e anatomopatológico foram coletados através do sistema informatizado do Hospital.

O seguimento em relação à sobrevida dos doentes foi feito através de consultas ambulatoriais. Para os pacientes que não mantiveram acompanhamento ambulatorial foram realizados contatos telefônicos com os mesmos ou familiares. Alguns óbitos foram confirmados através dos registros do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) da cidade de São Paulo. Estipulamos o tempo de cinco anos de seguimento para o estudo de sobrevida.

3.3. Técnica Operatória

Todas as operações foram realizadas pela equipe da Divisão de Clínica Cirúrgica II – Serviço de Cirurgia do Pâncreas e Vias Biliares do HCFMUSP, seguindo a padronização cirúrgica do grupo.

A extensão tumoral era avaliada no início do ato operatório após exploração completa da cavidade abdominal, verificando-se presença de doença avançada localmente ou metástases a distância não diagnosticadas pré-operatoriamente. Uma vez confirmada a ressecabilidade, realizava-se operação radical (duodenopancreatectomia ou gastroduodenopancreatectomia) e linfadenectomia regional.

Todos os casos foram reconstruídos com dupla alça (figura 2), conforme técnica descrita no Serviço, utilizando-se uma alça exclusiva para a anastomose pancreatojejunal e outra para anastomose hepaticojejunal (121). Nos pacientes operados mais recentemente, deu-se preferência à preservação pilórica, desde que esta opção não comprometesse a radicalidade da ressecção.

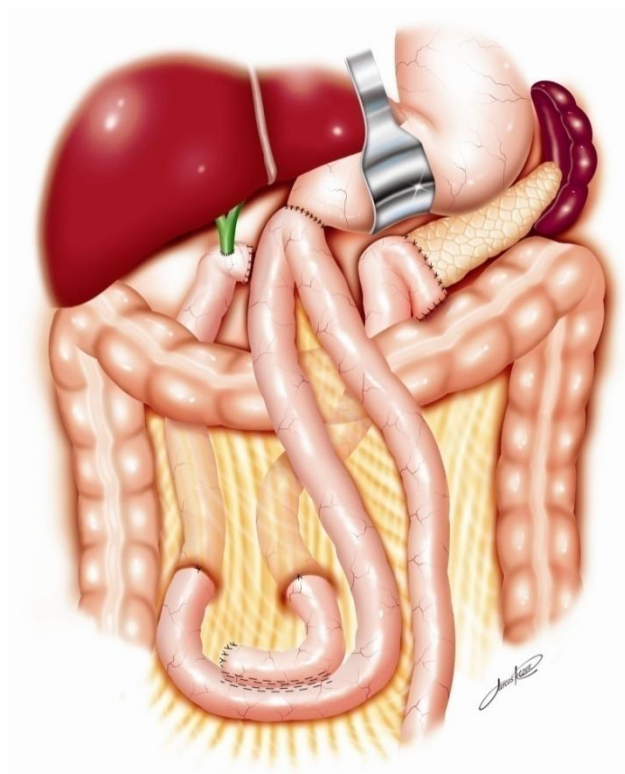


Figura 2: Esquema representativo de técnica cirúrgica para reconstrução de duodenopancreatectomia utilizando dupla alça para anastomose biliar e pancreática.

3.4. Estudo Histopatológico

Os relatórios dos exames anatomopatológicos e as lâminas referentes aos tumores de cada paciente foram recuperados no Serviço de Arquivo do Departamento de Patologia do HCFMUSP. As lâminas com coloração de hematoxilina e eosina foram novamente examinadas por dois patologistas experientes do Departamento de Patologia do HCFMUSP que não tinham conhecimento da evolução do paciente.

Caracterizou-se o grau de diferenciação em bem, moderadamente e pouco diferenciado, a condição das margens cirúrgicas, infiltração de estruturas

adjacentes, a ocorrência e o número de metástases linfonodais e invasão vascular, linfática ou perineural. O tamanho do tumor em seu maior eixo foi recuperado do relatório de exame anatomopatológico original. Os tumores foram estadiados de acordo com a *Union Internationale pour le Controle du Cancer* (UICC – 2002) (Anexo A).

Dois patologistas experientes classificaram esses adenocarcinomas em tipo intestinal e pancreatobiliar, baseados nas características citológicas e arquiteturais, conforme descrição de Albores-Saavedra (20). Os tumores do tipo intestinal (Figura 3) são histologicamente indistinguíveis dos tumores colorretais. Nos tumores bem diferenciados, verifica-se formação de glândulas tubulares e vilos em estroma desmoplásico mínimo a moderado. Áreas de complexo cribiforme e áreas sólidas podem estar presentes. Em tumores pouco diferenciados predominam as áreas sólidas. As glândulas e áreas cribiformes podem exibir necrose central com células inflamatórias. As células são colunares com núcleo ovais em arranjo pseudoestratificado próximos ao pólo basal. Os núcleos geralmente assemelham-se uns aos outros, e o número de mitoses é variável. Nos tumores bem diferenciados, podem ser vistos borda em escova bem definida em pólo luminal, células caliciformes e mais raramente células de Paneth.

O tipo pancreatobiliar (Figura 4) assemelha-se aos tumores primários do pâncreas e ductos biliares extra-hepáticos. Esses tumores quando bem diferenciados apresentam glândulas simples ou ramificadas em estroma desmoplásico mínimo a moderado. Formações papilares focais ou micropapilares

podem estar presentes. As células são cubóides ou colunares baixas e geralmente estão dispostas em camada única, sem pseudoestratificação nuclear. Os núcleos são mais arredondados que no tipo intestinal e frequentemente apresentam variação de tamanho e forma. Pode haver um alto grau de pleomorfismo nuclear mesmo na presença de glândulas bem formadas. Nos tumores pouco diferenciados, áreas sólidas ou mesmo células isoladas são encontradas.

Nos casos com padrão histológico misto, a classificação foi daquele tipo histológico mais predominante (122). Outros tipos menos comuns de adenocarcinoma são o carcinoma papilar invasivo, o carcinoma mucinoso (colóide), o adenoescamoso, o carcinoma com células em anel de sinete e o carcinoma de células claras.

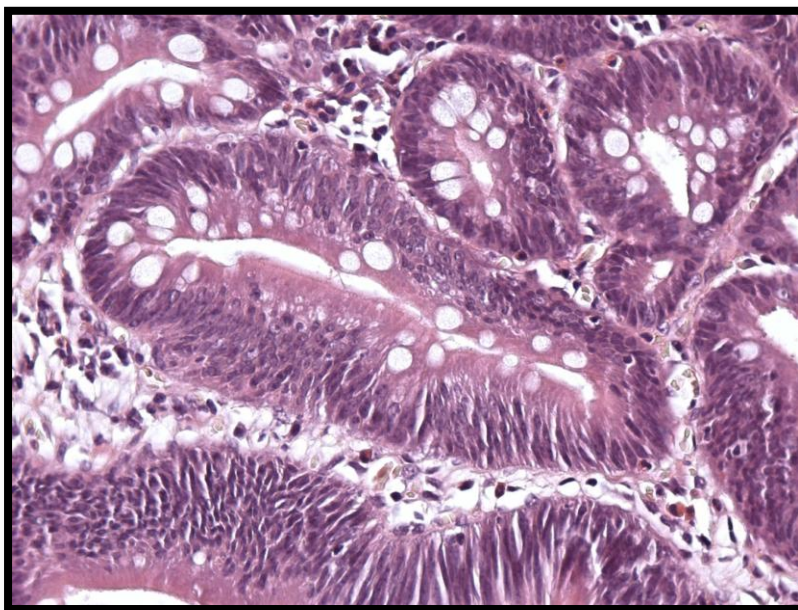


Figura 3: Adenocarcinoma da ampola de Vater do tipo intestinal, com células de Paneth (H&E, 400x).

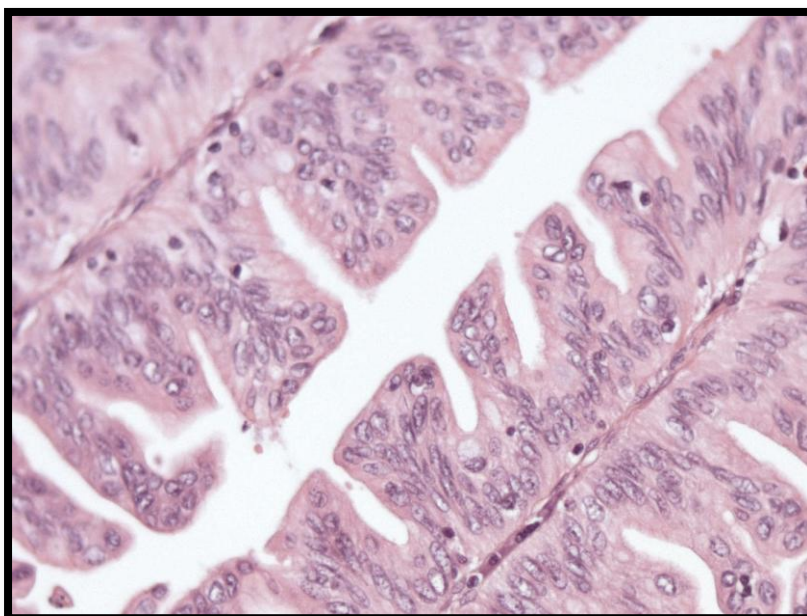


Figura 4: Adenocarcinoma da ampola de Vater do tipo pancreatobiliar, com atipia celular (H&E, 400x).

3.5. *Tissue Microarray*

Cortes histológicos representativos dos casos, corados pela hematoxilina e eosina foram revisados pelos patologistas e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. Os blocos de parafina contendo os cortes histológicos das peças cirúrgicas foram recuperados no arquivo-blocário da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um bloco de parafina receptor através de um sistema mecanizado de precisão (Beecher Instruments), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros (figura 3).

Cada cilindro amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definido num sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constituiu uma micromatriz tecidual (TMA) com 16 linhas e 13 colunas. No total, o TMA construído contém 208 posições, sendo 194 amostras de 97 casos, com 2 amostras por caso mais 9 amostras de tecidos controle (mucosa duodenal e do ducto pancreatobiliar) e 5 espaços em branco para determinar o posicionamento do TMA. Foram realizados dois blocos de TMA idênticos, adicionais, de forma que estarão disponíveis para análise de 1 a 6 amostras de cada caso distribuídas pelo total de 3 blocos de TMA receptores. Duas amostras por caso foram avaliadas para cada marcador. Uma vez prontos, os blocos de TMA foram cortados em secções histológicas de 3 μ m (Leica Instruments), em lâminas carregadas positivamente

(carga elétrica). De cada um dos blocos de TMA foram cortadas 50 lâminas, sendo três delas coradas pela hematoxilina e eosina, e as 47 restantes reservadas aos estudos imunoistoquímicos (figura 4).



Figura 5: Equipamento que realiza cortes histológicos nos blocos de parafina para realização do TMA.

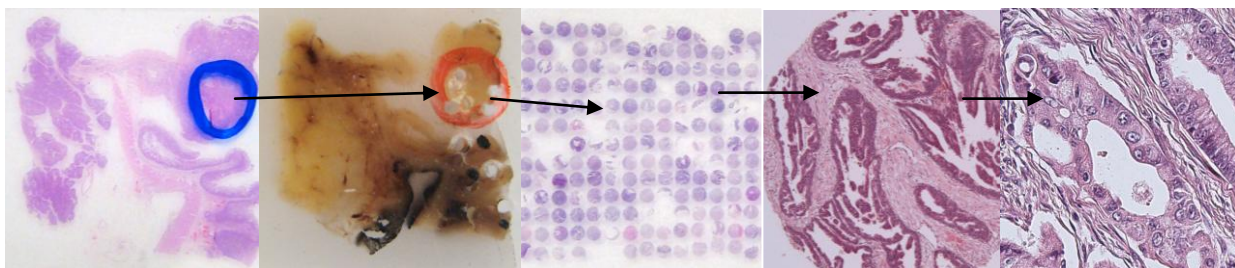


Figura 6: Preparo do bloco de TMA; 1 seleção da área na lâmina de H&E, 2 seleção da área no bloco de parafina, 3 lâmina de TMA em H&E, 4 . lâmina de TMA em H&E aumento 100x, 5 lâmina de TMA em H&E aumento 400x.

3.6. Imunoistoquímica

Para análise imunoistoquímica os blocos foram seccionados e submetidos à desparafinização a quente com xilol a 60°C por trinta minutos e, a seguir, a desparafinização a frio com xilol à temperatura ambiente por 10 minutos. Os cortes histológicos foram hidratados em solução com concentrações decrescentes de etanol e a seguir lavados com água destilada. Para induzir bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas em água oxigenada a 6% (20 volumes) por 20 minutos. A seguir, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor, durante 2 a 5 minutos em panela de pressão, imersos em solução de ácido cítrico 0,01M no pH 6,0 ou solução TRIS/EDTA pH 9,0. Após esta etapa inicial, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, por um minuto, três vezes.

Cada lâmina foi incubada com o anticorpo primário, específico para o antígeno, diluído em solução de albumina a 1% em PBS, em câmara úmida, por 18 horas a 4°C. As lâminas foram então lavadas por 3 vezes em tampão PBS. Os anticorpos utilizados para classificação histológica das neoplasias foram: anticorpo monoclonal para citoqueratina 7, citoqueratina 17, citoqueratina 20, apomucina MUC1 (mammary gland-type apomucin), apomucina MUC2 (apomucin of intestinal goblet cell type), apomucin MUC5AC (apomucin of gastrical foveolar cells type), apomucina MUC6, antígeno CA19-9, antígeno carcinomaembrionário (CEA), CDX2 e CD10. Outros anticorpos monoclonais específicos testados para determinação de

alterações genéticas foram: proteína p53, anticorpo anti p16, anti KI67, anti-*hMSH2*, anti-*hMLH1* e anti *hMSH6* (Tabela 1).

Após a reação primária as amostras foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (LSAB+, Dako) ou com polímero (Max Polímero, zymed) específico para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário, em câmara úmida por 1 hora ou 30 minutos, a 37°C e posteriormente lavadas com PBS por um minuto, três vezes.

Aplicou-se então o conjugado enzimático polímero peroxidase (Max polímero, Zymed) ou complexo Avidina-biotina-peroxidase (LSAB+, Dako), em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, seguindo lavagem em tampão PBS, por 3 vezes. Foi realizada a revelação com substrato cromogênico (diaminobenzidina a 60% em PBS + 1,5mL de água oxigenada a 20 volumes) por 3 a 5 minutos e após lavagem com água corrente destilada. Realizou-se contracoloração com hematoxilina de Harrys, Mayer ou Carazzi, e após lavados com água corrente e destilada. Foi então feita desidratação dos cortes com álcool com concentrações crescentes 50%, 95% e absoluto) e xilol, por 3 vezes. Foram então montadas as lâminas em Entellan, para análise dos resultados.

Tabela 1: Relação dos anticorpos utilizados nas reações imunoistoquímicas.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Código
Monoclonal				
Anti MUC 1	Ma 695	Novocastra	1:1000	NCL-MUC-1
Anti MUC 2	Ccp58	Dako	1:50	NCL-MUC-2
Anti MUC 5AC	CLH2	Novocastra	1:200	NCL-MUC-5AC
Anti MUC 6	CLH5	Novocastra	1:125	NCL-MUC-6
Anti CDX2	AMT28	Novocastra	1:50	NCL-CDX2
Anti CK7	OV-TL-12/30	Dako	1:25000	M 7018
Anti CK17	E3	Novocastra	1:50	NCL-CK17
Anti CK20	Ks20-8	Dako	1:400	M7019
Anti CD10	56C6	Novocastra	1:100	NCL-CD10-270
Anti p53	D07	Dako	1:50	M7001
Anti p16	6H2	Novocastra	1:100	NCP-P16
Anti Ki-67	KIS5	Dako	1:250	PP3.30
Anti CA19-9	116-ns-19.9	Dako	1:100	M3517
Anti CEA	11-7	Dako	1:400	M7072
Anti MLH1	G168-15	BD	1:200	551092
Anti MSH2	MSH2	Novocastra	1:200	NCL-MSH2
Anti MSH6	44	BD	1:400	610919

3.7. Análise dos Resultados de Imunoistoquímica

A análise do resultado da imunoistoquímica foi realizada por um único patologista experiente (RP). Todos os cortes histológicos foram examinados, usando

sistema pré-definido de graduação. A reatividade nuclear e citoplasmática foi classificada semiquantitativamente numa escala de 0 a 3 para distribuição (distribuição: 0 = ausência de coloração na amostra corada; 1=células positivas esparsas, menos de 10% da amostra; 2=várias áreas de positividade, correspondendo a 10% a 50% da amostra celular; e 3=quase todas as células uniformemente positivas, ou acima de 50%).

Análise da imunoexpressão de MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 e CDX2

A imunorreatividade para a expressão de mucinas foi definida pela presença de grânulos citoplasmáticos corados. Foi considerada alterada para esses marcadores quando a reatividade da leitura foi maior ou igual a 1 na escala 1, 2 ou 3 para distribuição.

Análise da imunoexpressão das citoqueratinas CK7, CK17, CK20 e do CD10

A imunorreatividade para a expressão de citoqueratinas e do CD10 foi definida pela presença de grânulos citoplasmáticos ou de membrana corados. Foi considerada alterada para esses marcadores quando a reatividade da leitura foi maior ou igual a 1 na escala 1, 2 ou 3 para distribuição.

Análise da imunoexpressão de p53, p16 e Ki67

A análise da imunoistoquímica para p53 e Ki67 corresponde à coloração nuclear e para o p16 à coloração citoplasmática. Foi considerada positiva para esses marcadores, quando a intensidade de leitura foi classificada como maior ou igual a 2 na escala 1 a 3 para distribuição.

Análise da imunoexpressão do CEA e CA19-9

A análise da imunoistoquímica para o CEA (antígeno carcinoma-embrionário) e para o CA 19-9 corresponde à coloração citoplasmática. Foi considerada positiva para esses marcadores, quando a intensidade de leitura foi classificada como maior ou igual a 1 na escala de 1 a 3 para distribuição.

Análise da imunoexpressão de hMLH1, hMSH2 e hMSH6

A expressão normal para os marcadores imunoistoquímicos das proteínas de reparo do DNA (MMR) hMLH1, hMSH2 e hMSH6 corresponde à uma coloração nuclear. Os casos foram considerados alterados para a expressão desses marcadores quando houve total ausência de reatividade nuclear para esses marcadores, frente a um controle positivo das amostras de tecido normal do TMA. Controles internos positivos (linfócitos, células epiteliais não neoplásicas e células estromais) encontradas nas mesmas amostras foram utilizadas para validar a ausência de coloração nuclear nas células neoplásicas como verdadeiros negativos.

Todos os casos alterados no TMA foram validados através de reação imunoistoquímica em lâminas com cortes convencionais. Os casos negativos no TMA que resultaram positivos na validação, foram considerados positivos para análise dos resultados.

3.8. Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS® versão 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois, USA). Em todos os testes foi considerada significância estatística valores de $p \leq 0,05$.

O teste Qui-quadrado de Pearson e o teste Exato de Fisher foram utilizados para comparação entre os resultados de variáveis categóricas. Para a comparação entre médias das variáveis contínuas foi utilizado o método de t-Student.

Para analisar os marcadores de origem histológica, foi aplicado o Modelo Linear Generalizado (*Generalized Linear Model* ou GLM) com distribuição binomial e função de ligação logística para identificar a chance de a origem tecidual ser pancreática. Esse modelo é equivalente a uma regressão logística habitual. Quando o efeito foi protetor (coeficiente negativo), o resultado foi apresentado como chance para origem intestinal.

Para classificar os tumores utilizando os marcadores imunoistoquímicos, foi aplicado o GLM para cada caso, categorizando uma probabilidade de ser tipo pancreatobiliar para cada caso. Para classificar os pacientes por tipo de tumor (intestinal ou pancreatobiliar) foi necessário encontrar um ponto de corte que maximizasse a sensibilidade e especificidade na curva ROC. Com a intenção de estimar uma distribuição de probabilidades para tal ponto de corte, foi adotado uma técnica de re-amostragem ("bootstrap"). A mediana dos pontos de corte obtidos após 5000 re-amostragens foi adotada para classificar os pacientes.

Calculou-se então a sensibilidade, especificidade e acurácia dessa nova classificação. A análise da intensidade da concordância entre as duas classificações foi feita pelo método Kappa.

Referente à análise de sobrevivência, foi ajustado o modelo de Kaplan-Meier e comparado pelo teste de Log-rank. Os pacientes foram acompanhados a partir da data do procedimento cirúrgico até a data do óbito (evento de interesse) ou último contato ambulatorial ou telefônico no período de cinco anos (censura).

Realizamos então a análise pelo modelo de risco proporcional com cura (*proportional hazard with cure*, ou modelo de Cox com cura) para determinar as variáveis independentes relacionadas à sobrevivência.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Características Clínicas

Noventa e sete pacientes com neoplasia de papila foram submetidos à ressecção cirúrgica entre janeiro de 1985 a dezembro de 2006. A média etária dos pacientes foi de 59,3 anos, com variação entre 23 a 83 anos. Cinquenta e oito doentes (59,8%) eram homens. Cinquenta e oito por cento dos doentes eram tabagistas e 57,3% etilistas. Os sintomas pré-operatórios mais frequentes foram: icterícia (84,3%), emagrecimento (79,6%) e dor abdominal (59,8%). Cinquenta e sete pacientes (58,8%) apresentaram perda de peso superior a 10% do peso habitual (Tabela 2). Dezenove doentes (19,6%) foram submetidos à passagem de prótese na via biliar pré-operatoriamente.

Sessenta doentes (61,9%) foram submetidos a duodenopancreatectomia com preservação pilórica e 37 (38,1%) a gastroduodenopancreatectomia, todos os pacientes tiveram reconstrução em dupla alça. O tempo médio do procedimento foi $581 \pm 150,3$ minutos. A transfusão sanguínea intra-operatória foi necessária em 40 doentes (41,2%), sendo 0,8 a média de concentrados de hemácias transfundidos.

Tabela 2: Características clínico-cirúrgicas gerais dos doentes com AAV.

	n=97
Média etária	59,3 ± 12,7
Sexo	
Masculino	58 (59,8%)
Feminino	39 (40,2%)
Sintomas pré-operatórios	
Icterícia	82 (84,5%)
Dor abdominal	58 (59,8%)
Perda de peso > 10% peso habitual	57(58,8%)
Náuseas e/ou vômitos	32 (33%)
Exames laboratorias pré-operatórios	
Hemoglobina (g/l)	11,9 ± 1,7
Bilirrubina total (mg/dl)	7,7 ± 9,4
Albumina (g/dl)	3,5 ± 0,7
Cirurgia realizada	
Duodenopancreatectomia	60(61,9%)
Gastroduodenopancreatectomia	37 (38,1%)

A taxa de complicações pós-operatórias foi de 58,7%, sendo o retardo de esvaziamento gástrico (29,9%) e a fístula pancreática (21,7%) as mais frequentes (Tabela 3). Ocorreram três óbitos (3,1%) relacionados ao procedimento, no 10º, 12º e 14º dias. Seis doentes foram reoperados, sendo dois por fístulas pancreáticas complicadas, dois para drenagem de coleção, um por coleperitônio e um por deiscência da aponeurose. O tempo médio de internação foi de 16,8 dias (8-58dias).

Tabela 3: Mortalidade e morbidade pós-operatória dos doentes com AAV submetidos a duodenopancreatectomia.

Mortalidade 30 dias pós-op	3	3,1%
Morbidade total	57	58,7%
Retardo no esvaziamento gástrico	29	29,9%
Fístula pancreática	21	21,7%
Infecção de ferida	21	21,7%
Abcesso intra-abdominal	4	4,1%
Fístula biliar	3	3,1%
Pneumonia	3	3,1%
Trombose venosa profunda	1	1%

4.2. Características anatomopatológicas

Todos os espécimes ressecados tratavam-se de adenocarcinomas. As margens foram histologicamente negativas em 96 casos ressecados. Uma paciente teve margem duodenal proximal comprometida (R1), apresentando recidiva precoce da doença e óbito após oito meses de seguimento.

O tamanho médio das lesões foi de $2,4\text{cm} \pm 1,36\text{cm}$, variando de 0,3 a 8 cm. A média de linfonodos dissecados foi $13,5 \pm 9,8$. Trinta e três pacientes (34%) apresentaram linfonodos comprometidos pela neoplasia, com mediana de dois linfonodos acometidos por paciente (variação de 1 a 10). Todos os pacientes foram estadiados de acordo com o manual de estadiamento do “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) como: estadio IA: 25 pacientes (T1N0M0, T1: limitado

à ampola de Vater ou esfíncter de Oddi); estadio IB: 19 pacientes (T2N0M0, T2: invadindo a parede duodenal); estadio IIA: 19 pacientes (T3N0M0, T3: invadindo o pâncreas); estadio IIB: 33 pacientes (qualquer T, N1M0, N1: metástases em linfonodos regionais); estadio IV: 1 paciente (qualquer T, qualquer N, presença de metástase). Um total de 22 tumores (22,7%) eram bem diferenciados [grau (G)1], 63 (64,9%) moderadamente diferenciados (G2), e 12 (12,4%) pouco diferenciados (G3) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: características anátomo-patológicas dos AAV ressecados.

	n=97	
Tamanho do tumor (cm)	0,3 – 8	2,4 ± 1,36*
Linfonodos dissecados	5 -4 7	13,5 ± 9,8*
Linfonodos metastáticos	33	34%
Grau histológico		
Bem diferenciado	22	22,7%
Moderadamente diferenciado	63	64,9%
Pouco diferenciado	12	12,4%
Invasão vascular	6	6,2%
Invasão linfática	28	28,9%
Invasão perineural	22	22,7%
Extensão		
Restrito à papila	30	30,9%
Pâncreas	33	34%
Duodeno	33	34%
Veia porta	1	1,1%

*média e desvio padrão

Tabela 5: Estadiamento e classificação TNM dos AAV.

Estadio	TNM	N	%
IA	T1, N0, M0	25	25,8
IB	T2, N0, M0	19	19,6
IIA	T3, N0, M0	19	19,6
IIB	Qualquer T, N1, M0	33	34
IV	Qualquer T e N, M1	1	1

4.3. Expressão imunoistoquímicos para diferenciação do epitélio de origem

Os tumores foram classificados segundo a origem tecidual em tipos intestinal (TI) em 43 casos (44,3%), tipo pancreatobiliar (TPB) em 47 casos (48,5%) e

outros tipos em 7 casos (7,2%) (5 adenocarcinomas mucinosos, 1 adenoescamoso e 1 adenocarcinoma de células claras).

A expressão imunoistoquímica do CDX2, MUC1, MUC2, CK7, CK20 e CD10 foram significativamente diferentes nos adenocarcinomas TI e TPB (Tabela 6). Os marcadores CDX2, MUC2, CD10 e CK20 são expressos com maior frequência no TI e os marcadores MUC1 e CK7 são mais expressos no TPB. Particularmente, 86% dos tumores TI expressaram CDX2, e 93,6% dos tumores TPB expressaram CK7. Trinta e dois tumores TI (74,4%) expressaram fortemente o CDX2 (escore 3+).

Quando analisamos a sensibilidade e a especificidade dos marcadores que tiveram significância na determinação do tipo histológico, pudemos notar que os marcadores com maior sensibilidade e especificidade são aqueles que predominam no tipo intestinal. O marcador com maior acurácia foi o CDX2 (82,2%), seguido do MUC2 (75,5%) e CK20 (73,3%). Os marcadores para o tipo pancreatobiliar, MUC1 e CK7, apresentam boa sensibilidade (84,8% e 95,7%, respectivamente), porém, por frequentemente marcarem também os TI, apresentam baixa especificidade (46,5% e 20,9%, respectivamente). O marcador com maior valor preditivo positivo para o tipo intestinal foi o CDX2 (78,7%) e para o tipo pancreatobiliar o MUC1 (62,9%) (Tabela 7, figuras 5 e 6).

Tabela 6: Positividade para marcadores imunoistoquímicos dos tumores tipo intestinal e pancreatobiliar.

	Tipo Intestinal (n=43)	Tipo Pancreatobiliar (n=47)	P*
	n (%)	n (%)	
MUC1	23 (53,5%)	39 (82,9%)	0,001
MUC2	32 (74,4%)	11 (23,4%)	<0,001
MUC5AC	29 (67,4%)	33 (70,2%)	0,436
MUC6	19 (44,2%)	21 (44,7%)	0,566
CDX2	37 (86%)	10 (21,3%)	<0,001
CK7	34 (79,1%)	44 (93,6%)	0,041
CK17	27 (62,8)	37 (78,7%)	0,096
CK20	33 (76,7%)	14 (29,8%)	<0,001
CD10	35 (81,4%)	24 (51,1%)	0,002

* Teste qui-quadrado de Pearson

Tabela 7: Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo positivo dos marcadores imunoistoquímicos para determinação do tipo histológico dos AAV.

	Tipo Intestinal	Tipo pancreatobiliar
MUC2	Sensibilidade: 74,4% Especificidade: 76,6% Acurácia: 75,5% VPP: 74,4%	
CK20	Sensibilidade: 76,7% Especificidade: 70,2% Acurácia: 73,3% VPP: 70,2%	
CD10	Sensibilidade: 81,4% Especificidade: 48,9% Acurácia: 64,4% VPP: 59,3%	
CDX2	Sensibilidade: 86% Especificidade: 78,7% Acurácia: 82,2% VPP: 78,7%	
MUC1		Sensibilidade: 84,8% Especificidade: 46,5% Acurácia: 66,3% VPP: 62,9%
CK7		Sensibilidade: 95,7% Especificidade: 20,9% Acurácia: 59,6% VPP: 56,4%

VPP; valor preditivo positivo

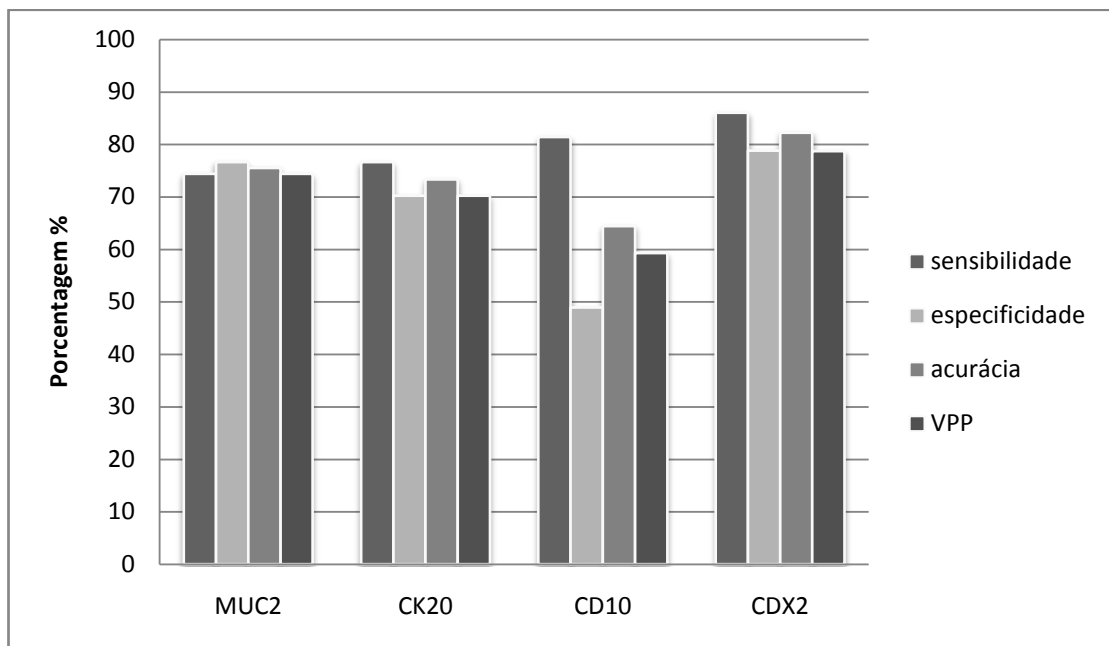


Figura 7: Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo positivo (VPP) dos marcadores para o AAV tipo intestinal.

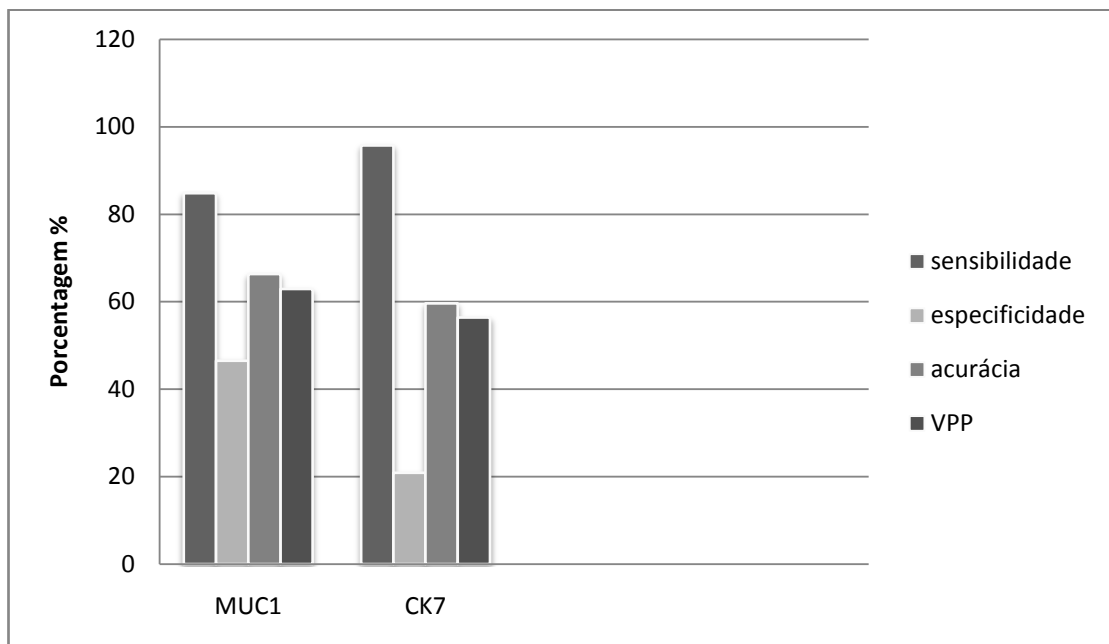


Figura 8: Sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo positivo (VPP) dos marcadores para o AAV tipo pancreatobiliar.

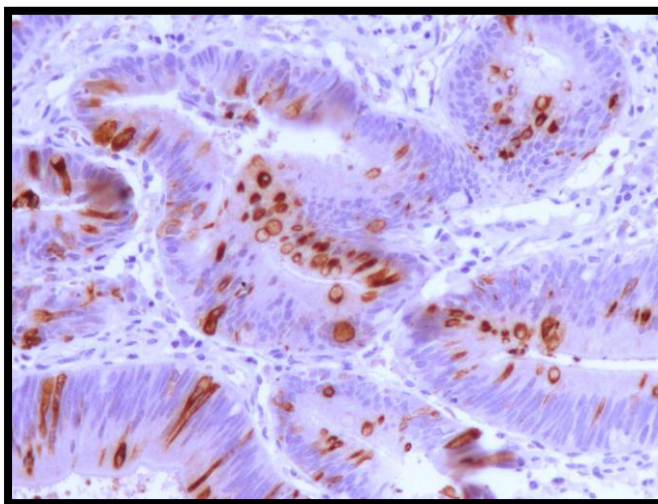


Figura 9: MUC2 – marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)

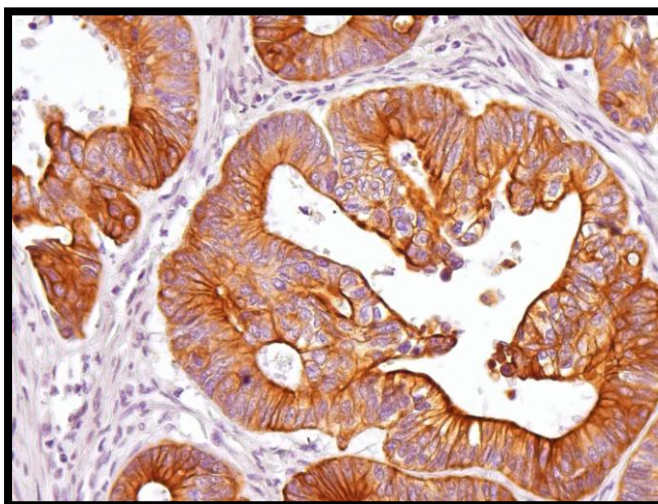


Figura 10: CK20 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)

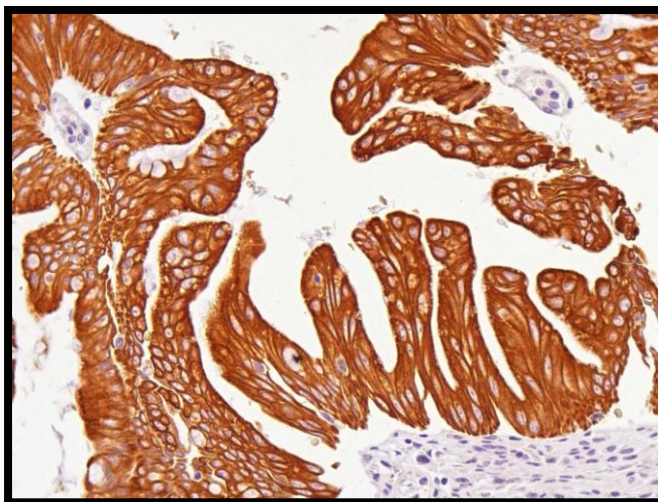


Figura 11: CDX2 – marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)

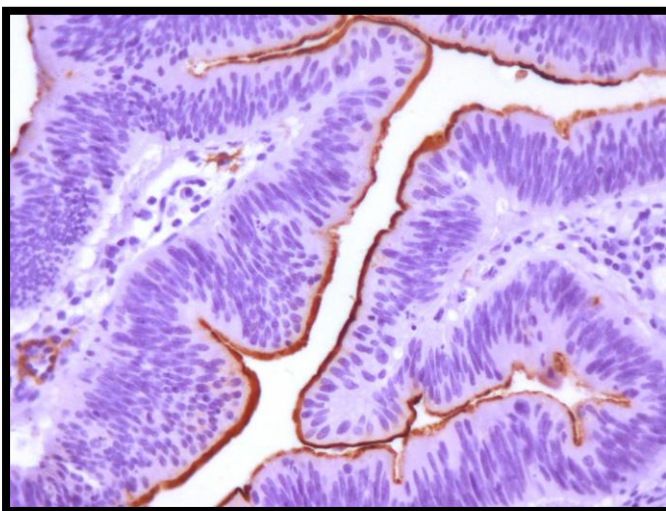


Figura 12: CD10 – marcação imunoistoquímica com padrão de membrana em AAV tipo intestinal (400x)

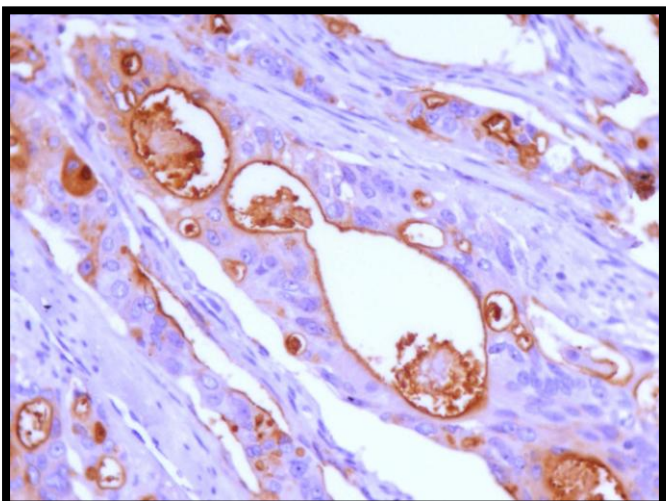


Figura 13: MUC1 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo pancreatobiliar (400x)

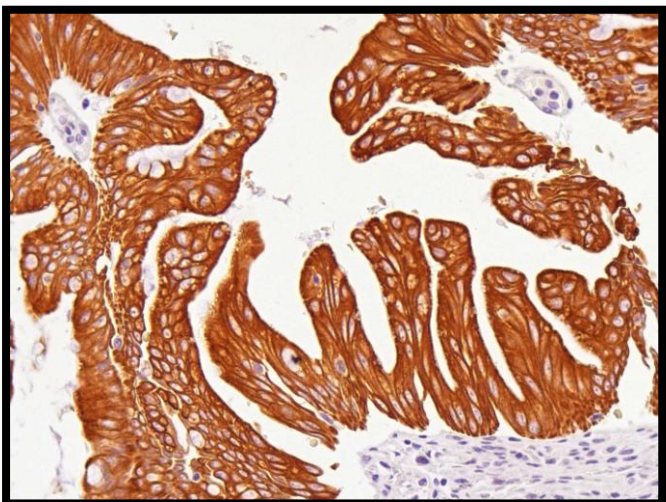


Figura 14: CK7 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático e de membrana em AAV tipo pancreatobiliar (400x)

Através da análise de Modelo Linear Generalizado (*Generalized Linear Model* ou GLM) com distribuição binomial e ligação canônica (logística), equivalente a uma regressão logística, identificamos como principais marcadores para a diferenciação do tipo histológico o MUC1, MUC2 e CDX2 (Tabela 8).

Tabela 8: Modelo linear generalizado para identificar os principais marcadores imunoistoquímicos para determinação do tipo histológico.

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Efeito	IC 95%	p
Intercepto	0,9507	1,2550	0,7213	(0,18; 0,97)	0,44876
MUC1	1,5025	0,7331	4,49295	(1,07; 18,9)	0,04041
MUC2	-1,6284	0,7471	5,0957§	(1,18; 22,4)	0,02930
MUC5AC	0,1424	0,7748	1,1530	(0,25; 5,26)	0,854178
MUC6	-0,1200	0,6995	1,1275§	(0,29; 4,44)	0,86375
CK7	0,9899	0,8678	2,6910	(0,49; 14,74)	0,25400
CK17	0,7993	0,7362	2,3560	(0,53; 10,3)	0,23900
CK20	0,2685	0,8350	1,3080	(0,25; 6,72)	0,74780
CD10	-0,8099	0,7962	2,248§	(0,47; 10,7)	0,30909
CDX2	-2,7204	0,7610	15,1864§	(3,42; 67,49)	0,00035

§ chance para tipo intestinal

Aplicamos o mesmo modelo usando apenas os marcadores que apresentaram significância estatística para diferenciação do tipo histológico. Determinamos então que um adenocarcinoma da ampola de Vater com MUC1 positivo tem 4,40 [IC 95%: 1,06; 18,19] vezes a chance de ser pancreático se comparado com outro MUC1 negativo. Um tumor MUC2 positivo tem 5,49 [IC 95%: 1,59; 18,93] vezes a chance de ser intestinal se comparado a outro MUC2 negativo.

Por fim, um carcinoma com CDX2 positivo tem 16,15 [IC 95%: 4,58; 56,97] vezes a chance de ser TI se comparado com outro CDX2 negativo (Tabela 9).

Tabela 9: Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores apontados como significantes para determinação do tipo histológico.

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Efeito	IC 95%	p
Intercepto	1,4388	0,7422	0,8083	(0,50; 0,95)	0.05256
MUC1	1,4810	0,7245	4,3943	(1,06; 18,19)	0.04094
MUC2	-1,7025	0,6317	5,4876§	(1,59; 18,93)	0.00703
CDX2	-2,7821	0,6431	16,1529§	(4,58; 56,97)	<0,0001

§ chance para tipo intestinal

Aplicamos o modelo para determinar o valor da associação do CDX2 e do MUC2 para a diferenciação do tipo histológico. Verificamos que a probabilidade de um adenocarcinoma da ampola de Vater CDX2 e MUC2 negativos ser TPB é 90% [IC 95% 0,73; 0,97]. Tumores que forem positivos para MUC2 e CDX2 tem 19,50 [IC 95%: 5,23; 72,77] vezes a chance de ser TI se comparado com um tumor que tem MUC2 e CDX2 negativos (Tabela 10).

Tabela 10: Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores MUC2 e CDX2 associados.

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Efeito	IC 95%	p
Intercepto	2,1972	0.6085	0,9000	(0,50; 0,95)	0,000305
MUC2+/CDX2+	-2,9704	0.6719	19,4997§	(5,23; 72,77)	< 0,0001

§ chance para o tipo intestinal

A probabilidade de um adenocarcinoma da ampola de Vater MUC1 negativo e CDX2 e MUC2 positivos ser do tipo intestinal é de 91,7%. Tumores que tiveram MUC1 negativo e MUC2 e CDX2 positivos tem 19,13 [IC 95%: 4,12; 88,85] vezes a chance de ser intestinal se comparado com um indivíduo que tem MUC1 positivo e MUC2 e CDX2 negativos (Tabela 11).

Tabela 11: Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores MUC1, MUC2 e CDX2 associados.

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Efeito	IC	p
Intercepto	2,3979	0,7385	0,9167	(0,72; 0,98)	0,001167
MUC1- /CDX2+/MUC2+	-2,9513	0.7835	19,1423§	(4,12; 88,85)	0.000165

§ chance para o tipo intestinal

Adenocarcinomas da ampola de Vater que tiveram MUC1 e CK7 negativos e MUC2 e CDX2 positivos tem 16,95 [IC 95%: 4,53; 63,41] vezes a chance de ser TI se comparado com outros que tenham MUC1 e CK7 positivos e MUC2 e CDX2 negativos (Tabela 12).

Tabela 12: Modelo linear generalizado para identificar os efeitos dos marcadores MUC1, CK7, MUC2 e CDX2 associados.

Coeficiente	Estimativa	Erro padrão	Efeito	IC	p
Intercepto	0,7932	0,2765	0,6885	(0,56; 0,79)	0,0412
MUC1-/CK7-	-2,8301	0,6732	16,9472§	(4,53; 63,41)	
/CDX2+/MUC2+					<0,0001

§ chance para tipo intestinal

Quando relacionamos cada marcador com critérios clínicos e anatomopatológicos, encontramos relação significativa com invasão neural ausente e CDX2 positivo ($p=0,027$), invasão neural ausente e CD10 positivo ($p=0,04$), invasão neural presente e CK7 positivo, invasão neural e invasão linfática presente e MUC 1 positivo ($p=0,029$), MUC5AC positivo e tamanho da lesão maior que 2cm ($p=0,04$) e idade maior que 60 anos ($p=0,04$). O marcador MUC1 positivo relacionou-se significativamente com carcinomas moderadamente e pouco diferenciados ($p=0,03$) e MUC2 positivo com carcinomas bem diferenciados ($p=0,045$). Nenhum marcador correlacionou-se significativamente com o estadio tumoral e presença de metástase linfonodal.

Sete tumores foram classificados como tipos incomuns. Analisamos como esses tumores expressaram os marcadores imunoistoquímicos (tabela 13) e aplicamos os modelos de regressão logística expostos nas tabelas 10 e 11, indicando dessa forma, qual a probabilidade de cada caso ser do tipo pancreatobiliar (tabela 14).

Tabela 13: Marcadores imunoistoquímicos para os tumores tipo incomuns .

	MUC 1	MUC 2	CDX 2	CD10	CK 20	CK7
Caso 1: mucinoso	+	+	-	-	-	+
Caso 2: mucinoso	-	+	+	+	+	-
Caso 3: mucinoso	+	+	+	+	+	+
Caso 4: mucinoso	+	+	+	-	+	+
Caso 5: mucinoso	-	+	+	+	+	-
Caso 6: células claras	+	-	-	-	-	+
Caso 7: adenoescamoso	+	-	-	-	-	+

Tabela 14: Análise da probabilidade de ser tipo pancreatobiliar dos tumores incomuns, segundo análise GLM.

	Probabilidade TPB (GLM Tabela 10)	Probabilidade TPB (GLM Tabela 11)
Caso 1: mucinoso	77,16%	89,99%
Caso 2: mucinoso	4,54%	31,58%
Caso 3: mucinoso	17,30%	31,58%
Caso 4: mucinoso	17,3%	31,58%
Caso 5: mucinoso	4,54%	31,58%
Caso 6: células claras	94,88%	89,99%
Caso 7: adenoescamoso	94,88%	89,99%

Realizamos então, utilizando apenas os resultados dos marcadores imunoistoquímicos CDX2, MUC2 e MUC1, uma nova classificação para o tipo histológico, aplicando o GLM da tabela 11. Foi atribuída a cada paciente uma

probabilidade para o tipo pancreatobiliar, de acordo com esse modelo logístico. Para escolher um ponto de corte que permitisse classificar os pacientes entre TI e TPB foi usada a técnica de “bootstrap” para selecionar o ponto que maximizasse a sensibilidade e a especificidade na curva ROC (figura 7). Esse ponto de corte foi de 0,534, ou seja, quem tem probabilidade maior que 53,4% foi classificado como TPB. Essa classificação imunoistoquímica apresenta 47 tumores do tipo intestinal e 40 do tipo pancreatobiliar, excluídos 3 casos onde não foi possível a realização dos 3 marcadores e os 7 casos de tumores incomuns. A sensibilidade dessa nova classificação para determinação do tipo histológico foi de 80%, a especificidade foi de 90,5% e a acurácia é de 85,1%. Na maioria dos tumores, a classificação imunoistoquímica e a classificação histológica foram concordantes (Kappa de 0,702, $p < 0,001$).

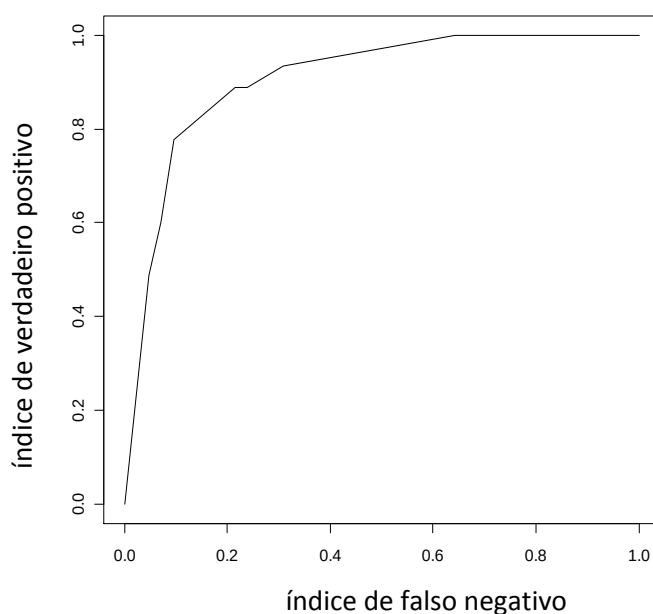


Figura 15: Curva ROC - Curva da relação de verdadeiros positivos (sensibilidade) em relação aos falsos negativos para determinação do tipo pancreatobiliar conforme variação do valor de ponto de corte

Tabela 15: Comparação da classificação histológica com a classificação imunoistoquímica dos AAV.

	Classificação Histológica		
	TI	TPB	Total
Classificação Imunoistoquímica			
Intestinal	38	9	47
Pancreatobiliar	4	36	40
Total	42	45	87

4.4. Marcadores imunoistoquímicos de alterações genéticas

Trinta e cinco pacientes (36,1%) apresentaram expressão imunoistoquímica para proteína p53. Houve relação entre p53 positivo e tumores menos diferenciados (teste de qui-quadrado de Pearson, $p=0,05$) e invasão linfática presente (teste de qui-quadrado de Pearson, $p=0,006$). Não houve diferença significativa da expressão de p53 entre os tipos intestinal e pancreatobiliar, tanto pela classificação histológica quanto pela imunoistoquímica (tabela 16).

Tabela 16: Relação entre imunoexpressão do p53 e características clínicas e anatomopatológicas

	P53 positivo (n=35)	P53 negativo (n=62)	Valores p
Sexo			0,644
Masculino	13	26	
Feminino	22	36	
Idade			
< 60 anos	20	36	0,930
≥ 60 anos	15	26	
pT			0,063
T1 e T2	17	42	
T3 e T4	18	20	
Acometimento linfonodal			0,626
Sim	13	20	
Não	22	42	
Estadiamento TNM			0,216
IA	5	20	
IB	7	12	
IIA	10	9	
IIB	13	20	
IV	0	1	
Diferenciação			0,050
Bem	8	14	
Moderado	18	43	
Pouco	9	5	
Invasão Vascular			0,885
Presente	2	4	
Ausente	33	58	
Invasão linfática			0,006
Presente	16	12	
Ausente	19	50	
Invasão perineural			0,328
Presente	6	16	
Ausente	29	46	
Tipo histológico			0,598
Intestinal	16	27	
Pancreatobiliar	15	32	
Classificação IH			0,574
TI	18	29	
TPB	13	27	

O p16 foi expresso em 30 AAVs (30,9%). Não houve diferença significativa da expressão de p16 entre os tipos intestinal e pancreatobiliar, tanto pela classificação histológica quanto pela imunoistoquímica; assim como critérios clínicos e anatomopatológicos (tabela 17).

Tabela 17: Relação entre imunoexpressão do p16 e características clínicas e anatomopatológicas

	P16 positivo (n=30)	P16 negativo (n=67)	Valores p
Sexo			0,634
Masculino	11	28	
Feminino	19	39	
Idade			0,557
< 60 anos	16	40	
≥ 60 anos	14	27	
pT			0,735
T1 e T2	11	27	
T3 e T4	19	40	
Acometimento linfonodal			0,626
Sim	11	22	
Não	19	45	
Estadiamento TNM			0,539
IA	6	19	
IB	6	13	
IIA	7	12	
IIB	10	23	
IV	1	0	
Diferenciação			0,337
Bem	7	15	
Moderado	21	40	
Pouco	2	12	
Invasão Vascular			0,297
Presente	3	3	
Ausente	27	64	
Invasão linfática			0,749
Presente	8	20	
Ausente	22	47	
Invasão perineural			0,918
Presente	7	15	
Ausente	23	52	
Tipo histológico			0,456
Intestinal	14	33	
Pancreatobiliar	16	27	
Classificação IH			0,206
TI	11	29	
TPB	19	28	

O Ki67 apresentou proliferação acentuada (acima de 10% das células coradas) em 36 AAVs (37,1%). Não houve diferença significativa da expressão do

Ki67 entre os tipos intestinal e pancreatobiliar, tanto pela classificação histológica quanto pela imunoistoquímica; assim como critérios clínicos e anatomopatológicos (tabela 18).

Tabela 18: Relação entre imunoexpressão do Ki67 e características clínicas e anatomopatológicas

	Ki67 positivo (n=36)	Ki67 negativo (n=61)	Valores p
Sexo			0,822
Masculino	15	24	
Feminino	21	37	
Idade			
< 60 anos	22	34	0,605
≥ 60 anos	14	27	
pT			0,965
T1 e T2	14	24	
T2 e T3	22	37	
Acometimento linfonodal			0,580
Sim	11	22	
Não	25	39	
Estadiamento TNM			0,679
IA	10	15	
IB	7	12	
IIA	8	11	
IIB	10	23	
IV	1	0	
Diferenciação			0,130
Bem	11	11	
Moderado	18	43	
Pouco	7	7	
Invasão Vascular			0,122
Presente	4	2	
Ausente	32	59	
Invasão linfática			0,856
Presente	10	18	
Ausente	26	43	
Invasão perineural			0,919
Presente	8	14	
Ausente	28	47	
Tipo histológico			0,755
Intestinal	19	28	
Pancreatobiliar	16	27	
Classificação IH			0,871
TI	16	24	
TPB	18	29	

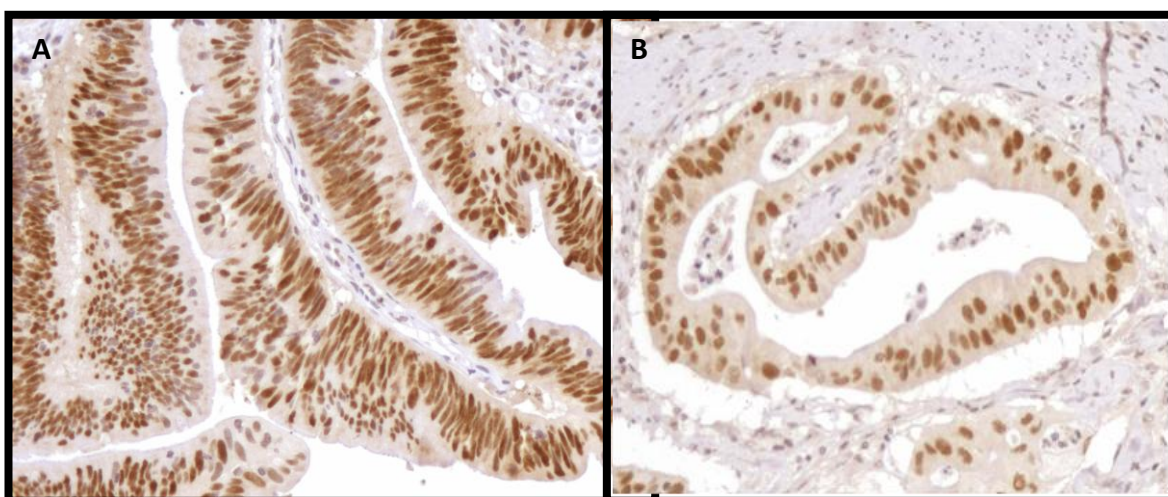


Figura 16: p53 - marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV, A tipo intestinal, B tipo pancreatobiliar (400x)

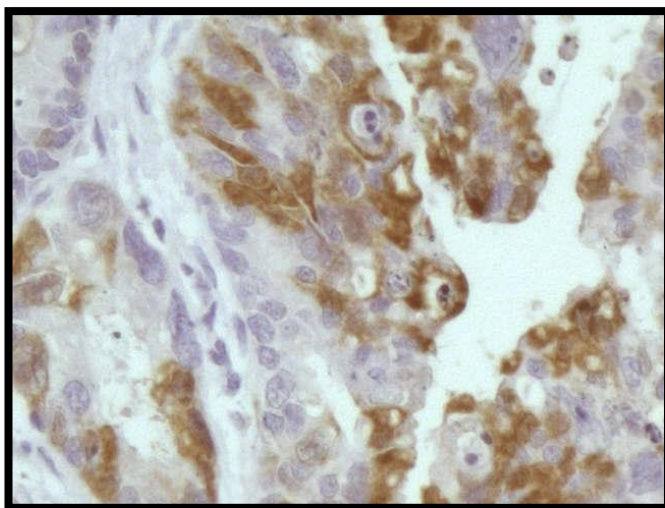


Figura 17: p16 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo pancreatobiliar (400x)

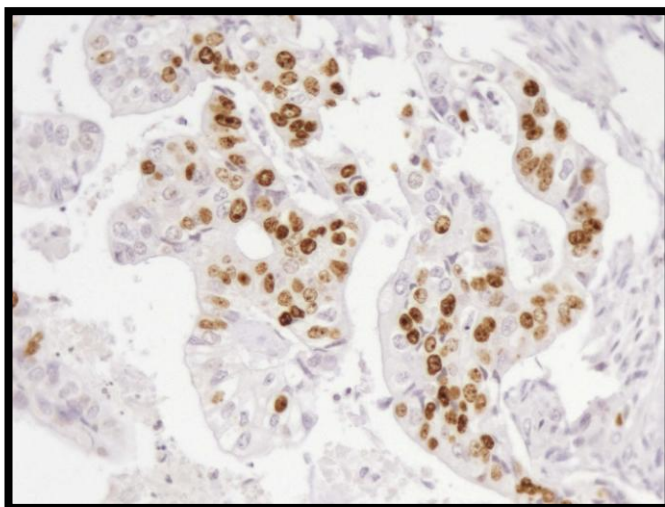


Figura 18: Ki67 – marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV tipo pancreatobiliar (400x)

4.5. Instabilidade de Microsatélites

Observou-se perda de expressão para os três marcadores de instabilidade de microssatélites, hMLH1, hMSH2 e hMSH6 em apenas 1 caso de AAV. Trata-se de um tumor do tipo intestinal histológico e imunoistoquímico, com sobrevivência acima de 200 meses. Houve um caso com dupla perda de expressão, hMSH6 e hMSH2, também do tipo histológico intestinal e longa sobrevivência. Treze casos (13,4%) apresentaram perda de expressão em pelo menos uma proteína MMR. Observou-se perda de expressão do hMLH1 em 3/96 (3,1%), do hMSH2 em 4/95 (4,2%) e do hMSH6 em 9/96 (9,4%) dos casos de AAV (tabela 19).

Tabela 19: Frequência das diversas possibilidades de perfis de expressão de proteínas MMR

		n	% em relação à pelo menos 1 negativo (n=13)
Um MMR negativo	MLH1- MSH2+ MSH6+	2	15,4%
	MLH1+ MSH2- MSH6+	2	15,4%
	MLH1+ MSH2+ MSH6-	7	53,8%
Dois MMR negativos	MLH1+ MSH2- MSH6-	1	7,7%
Três MMR negativos	MLH1- MSH2- MSH6-	1	7,7%
	Total	13	100%

Não houve correlação entre as variáveis analisadas e a alteração de hMLH1, hMSH2 e hMSH6 (tabela 20, 21 e 22).

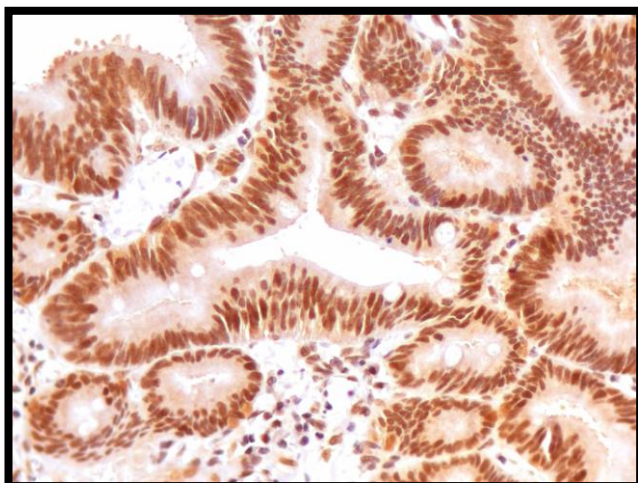


Figura 19: hMLH1 - marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV tipo intestinal (400x)

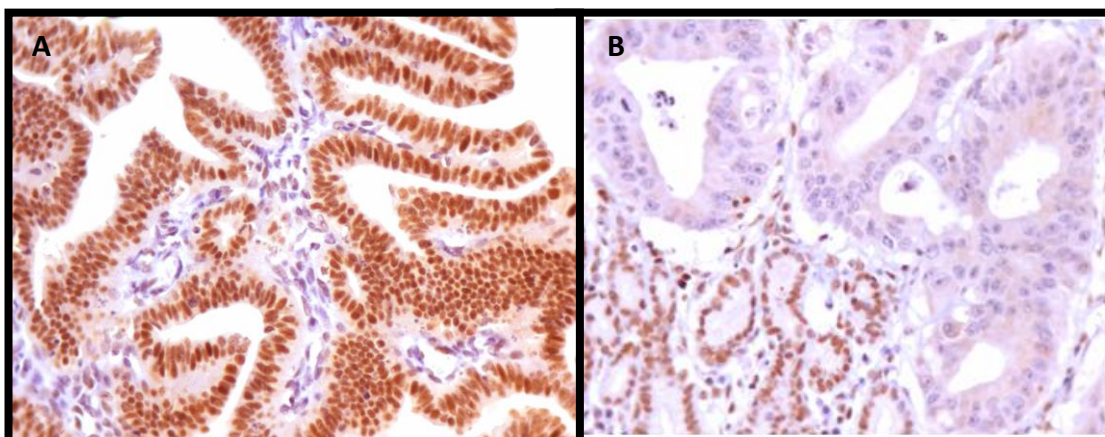


Figura 20: hMSH2 -marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV; A, positiva; B, negativa frente a controle de tecido não neoplásico positivo (400x)

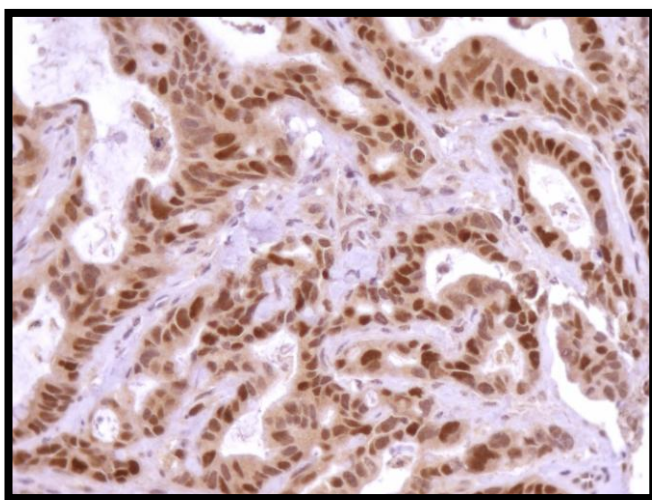


Figura 21: hMSH6 - marcação imunoistoquímica de padrão nuclear em AAV tipo pancreatobiliar (400x)

Tabela 20: Relação entre expressão de hMLH1 e características clínicas e anatomopatológicas

	hMLH1 alterado (n=3)	hMLH1 não alterado (n=93)	Valores p
Sexo			0,822*
Masculino	2	56	
Feminino	1	37	
Idade			
< 60 anos	3	38	0,069*
≥ 60 anos	0	56	
pT			0,275*
T1 e T2	3	55	
T2 e T3	0	38	
Acometimento linfonodal			1,000*
Sim	2	61	
Não	1	32	
Estadiamento TNM			0,902*
IA	1	23	
IB	1	18	
IIA	0	20	
IIB	1	31	
IV	0	1	
Diferenciação			0,481*
Bem	0	22	
Moderado	2	58	
Pouco	1	13	
Invasão Vascular			1,000*
Presente	3	87	
Ausente	0	6	
Invasão linfática			0,544*
Presente	3	65	
Ausente	0	28	
Invasão perineural			1,000*
Presente	3	71	
Ausente	0	22	
Tipo histológico			1,000*
Intestinal	1	42	
Pancreatobiliar	2	44	
Classificação IH			0,497*
TI	0	40	
TPB	2	45	

*teste exato de Fisher

Tabela 21: Relação entre expressão de hMSH2 e características clínicas e anatomopatológicas

	hMSH2 alterado (n=4)	hMSH2 não alterado (n=91)	Valores p
Sexo			1,000*
Masculino	2	55	
Feminino	2	36	
Idade			
< 60 anos	2	37	0,545*
≥ 60 anos	2	54	
pT			1,000*
T1 e T2	3	55	
T2 e T3	1	36	
Acometimento linfonodal			1,000*
Sim	3	60	
Não	1	31	
Estadiamento TNM			0,474*
IA	1	23	
IB	1	18	
IIA	1	18	
IIB	1	31	
V	0	1	
Diferenciação			0,693*
Bem	0	22	
Moderado	4	55	
Pouco	0	14	
Invasão Vascular			1,000*
Presente	4	85	
Ausente	0	6	
Invasão linfática			1,000*
Presente	3	65	
Ausente	1	26	
Invasão perineural			1,000*
Presente	3	70	
Ausente	1	21	
Tipo histológico			1,000*
Intestinal	2	41	
Pancreatobiliar	2	43	
Classificação IH			1,000*
TI	2	45	
TPB	2	37	

*teste exato de Fisher

Tabela 22: Relação entre expressão de hMSH6 e características clínicas e anatomopatológicas

	hMSH6 alterado (n=9)	hMSH6 não alterado (n=87)	Valores p
Sexo			0,737*
Masculino	5	53	
Feminino	4	34	
Idade			
< 60 anos	4	36	0,563*
≥ 60 anos	5	51	
pT			0,312*
T1 e T2	7	51	
T2 e T3	2	36	
Acometimento linfonodal			0,158*
Sim	8	55	
Não	1	32	
Estadiamento TNM			0,576*
IA	3	21	
IB	3	16	
IIA	2	17	
IIB	1	32	
V	0	1	
Diferenciação			0,788*
Bem	2	20	
Moderado	5	55	
Pouco	2	12	
Invasão Vascular			1,000*
Presente	9	81	
Ausente	0	6	
Invasão linfática			1,000*
Presente	7	61	
Ausente	2	26	
Invasão perineural			0,113*
Presente	9	65	
Ausente	0	21	
Tipo histológico			0,305*
Intestinal	6	37	
Pancreatobiliar	3	43	
Classificação IH			0,727**
TI	4	43	
TPB	5	35	

*teste exato de Fisher

4.6. Expressão do CEA e CA 19-9

Setenta e sete doentes apresentaram imunoeexpressão positiva para CEA (79,4%) e 86 (88,6%) foram positivos para a expressão de CA19-9. O CEA correlacionou-se significativamente com o p16, CA19-9 e CDX2 (Tabela 23). Entretanto, não houve diferença na expressão do CEA entre o TI e TPB. Também não houve relação da expressão do CEA com expressão de marcadores de instabilidade de microssatélites, assim como demais características clínicas e anatomopatológicas.

Tabela 23: Relação entre a imunoeexpressão do CEA e demais marcadores imunoistoquímicos

	CEA positivo (n=77)	CEA negativo (n=20)	Valores p
P16			0,003§
Positivo	29	1	
negativo	48	19	
CA19.9			0,031*
Positivo	71	15	
negativo	6	5	
CDX2			0,023*
Positivo	45	6	
negativo	32	14	

§ teste exato de Fischer

* teste Qui-quadrado de Pearson

Quando comparamos o marcador CA19-9 com variáveis clínicas, anatomopatológicas e demais marcadores, encontramos apenas relação com o sexo masculino (teste de qui-quadrado de Pearson, $p=0,019$).

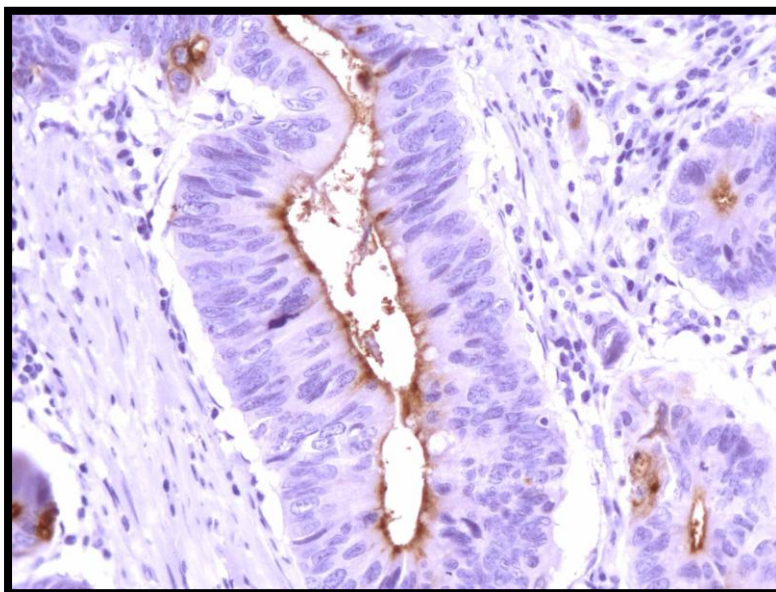


Figura 22: CEA - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo intestinal (400x)

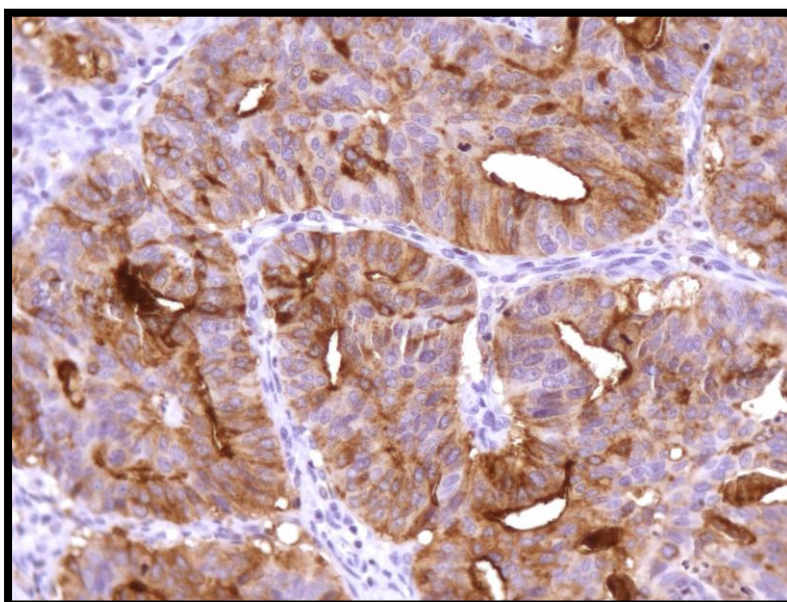


Figura 23: CA19-9 - marcação imunoistoquímica de padrão citoplasmático em AAV tipo pancreatobiliar (400x)

4.7. Análise da expressão dos marcadores relacionados à carcinogênese com o tipo histológico

Realizamos a comparação da expressão dos diversos marcadores entre os tipos histológicos e pela classificação imunoistoquímica (Tabela 24). Não encontramos nenhuma diferença significativa para a expressão desses marcadores entre os tipos tumorais.

Tabela 24: Expressão dos marcadores relacionados à carcinogênese e o tipo histológico e classificação imunoistoquímica dos AAVs

Marcador	Tipo histológico		p	Classificação Imunoistoquímica		P
	TI	TPB		TI	TPB	
p53	16 (37,2%)	15 (31,9%)	0,598*	18 (38,3%)	13 (32,5%)	0,574*
p16	16 (37,2%)	14 (29,8%)	0,456*	19 (40,4%)	11 (27,5%)	0,206*
Ki67	16 (37,2%)	19 (40,4%)	0,755*	18 (38,3%)	16 (40%)	0,871*
CEA	36 (83,7%)	36 (76,6%)	0,399*	40 (85,1%)	31 (77,5%)	0,361*
CA 19-9	36 (83,7%)	44 (93,6%)	0,136*	40 (85,1%)	38 (95%)	0,131*
hMLH1	1 (2,3%)	2 (2,3%)	0,526§	2 (4,3%)	0 (0%)	0,289§
hMSH2	2 (4,7%)	2 (4,4%)	0,674§	2 (4,3%)	2 (5,1%)	0,618§
hMLH6	6 (14%)	3 (6,5%)	0,209§	4 (8,5%)	5 (12,5%)	0,397§
MMR alterado	6 (14%)	7 (15,2%)	0,866*	5 (10,6%)	7 (17,5%)	0,355*

* teste Qui-quadrado de Pearson § teste exato de Fisher

4.8. Fatores associados à recidiva precoce ou longa sobrevivência livre de doença

Comparamos os doentes que apresentaram óbito precoce, em menos de 20 meses, relacionado à doença neoplásica (n=18) com aqueles com sobrevivência maior que 120 meses (n=26). Verificamos a relação entre Ki67 negativo (teste exato de Fisher, $p<0,001$) e alteração de pelo menos uma proteína de reparo (teste exato de Fisher, $p=0,015$) com sobrevivência maior que 120 meses (tabela 25).

Tabela 25: Comparação entre doentes com óbito após menos de 20 meses do tratamento cirúrgico e aqueles com sobrevivência maior que 120 meses, em relação aos critérios clínicos, anatomopatológicos e marcadores imunoistoquímicos

	Óbito < 20 meses (n=18)	Óbito >120meses (n=26)	Valores p
Idade			0,540*
<60anos	8	10	
≥ 60 anos	14	12	
Pt			0,118*
T1 e T2	9	19	
T2 e T3	9	7	
Acometimento linfonodal			0,100*
Sim	10	8	
Não	8	18	
Estadiamento TNM			0,372*
IA	4	10	
IB	3	4	
IIA	1	4	
IIB	9	8	
V	1	0	
Tipo histológico			0,604*
Intestinal	8	8	
Pancreatobiliar	10	14	
Classificação IH			0,338*
TI	10	8	
TPB	8	12	
p53			0,119§
positivo	3	10	
negativo	15	16	
p16			0,258*
positivo	7	6	
negativo	11	20	
Ki67			<0,001§
positivo	11	2	
negativo	7	24	
hMLH1			0,186§
positivo	18	22	
negativo	0	3	
hMSH2			0,595§
positivo	17	24	
negativo	0	1	
hMSH6			0,055§
positivo	18	20	
negativo	0	5	
MMR alterado			0,015§
Sim	7	18	
Não	0	18	

* teste Qui-quadrado de Pearson § teste exato de Fisher

4.9. Análise de Sobrevivência

O seguimento médio dos doentes foi de 80 meses, variando de 9 a 321 meses. A sobrevivência global foi de 90,3% em um ano, 71,5% em 3 anos, 64,2% em 5 anos e 53,3% em 10 anos. A sobrevivência média foi de 150,4 meses, com mediana de 128,2. Quatorze pacientes perderam seguimento, porém apenas sete antes de completarem 5 anos de sobrevivência. Trinta e cinco pacientes estão vivos até o momento. Quinze pacientes permanecem vivos há mais de 10 anos da operação. Para análise de sobrevivência foram excluídos os três casos de óbito intra-hospitalar.

Fatores clínicos e anatomopatológicos foram analisados a fim de determinar os que afetaram a sobrevivência. Na análise univariável, estiveram relacionados com pior sobrevivência a presença de linfonodos acometidos pela neoplasia, estadiamento TNM, invasão linfática e a classificação histológica (Tabela 26, figuras 8-11).

Tabela 26: Fatores relacionados à sobrevivência, em análise univariada.

Variável	N	Sobrevivência média (meses)	p*
Linfonodos			<0,001
Positivos	32	36,7±3,8	
Negativos	62	53,8±1,9	
Estadio			<0,001
I	43	53,8±2,5	
II	50	43,8±2,8	
III	0		
IV	1	5,49±0	
Tipo histológico			0,021
Intestinal	41	51,78 ± 2,61	
pancreatobiliar	46	44,04 ± 2,10	
Classificação IH			0,084
TI	45	50,13± 2,85	
TPB	39	43,68 ± 3,31	
Invasão linfática			0,004
Presente	26	38,72 ± 3,99	
Ausente	68	51,27 ± 2,14	
CDX2			0,129
Positive	49	50,21 ± 2,69	
Negativo	45	45,22 ± 3,01	
P53			0,940
Positive	34	47,34 ± 3,08	
Negativo	60	48,08 ± 2,64	
P16			0,500
Postivo	30	46,32 ± 3,87	
negativo	64	48,35 ± 2,37	
KI67			0,404
Positive	36	45,17 ± 3,71	
Negativo	58	49,47 ± 2,28	
CEA			0,320
Positive	74	46,86 ± 2,31	
Negativo	20	51,14 ± 31	
CA19-9			0,760
Positive	83	47,71 ± 2,12	
Negativo	11	47,49 ± 6,81	
hHMLH1			0,813
positive	90	47,14 ±2,07	
negativo	3	60,00 ± 0	
hHMSH2			0,867
positive	89	47,82 ± 2,07	
negativo	3	57,07 ± 5,60	
hHMSH6			0,235
positive	85	49,37 ±2,17	
negativo	8	59,92 ±0,11	
MMR alterado			0,631
sim	12	58,50 ± 1,53	
não	81	45,88 ±2,22	

*teste de Log-rank

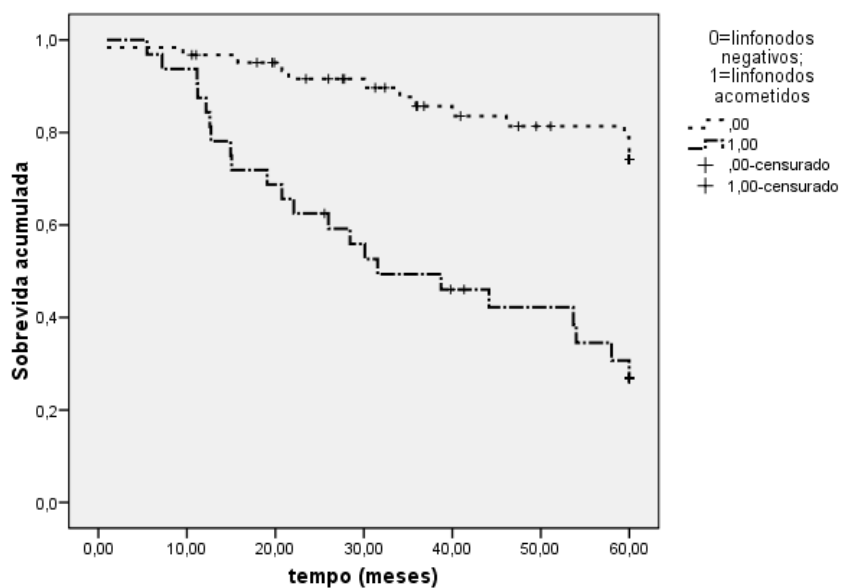


Figura 24: Curva de sobrevivência em cinco anos em relação ao acometimento linfonodal, $p<0,001$

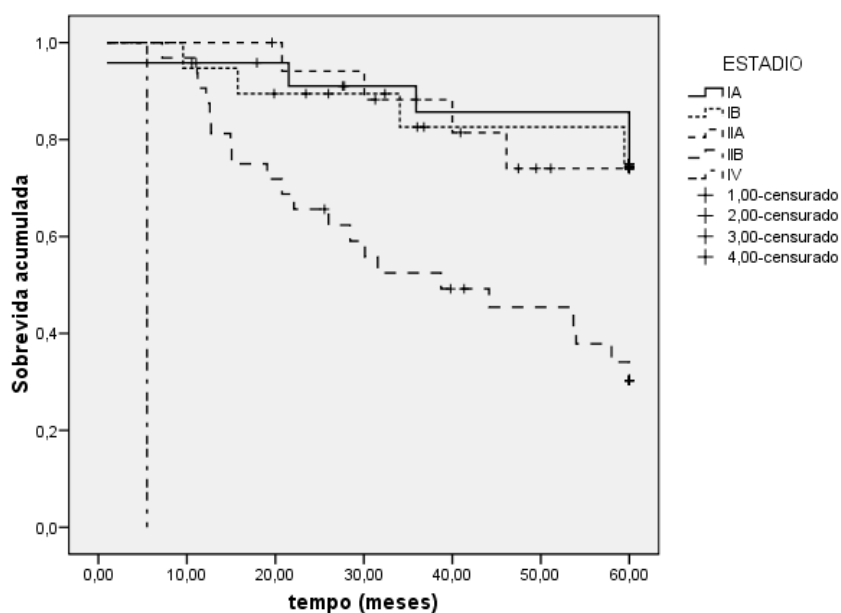


Figura 25: Curva de sobrevivência em cinco anos em relação ao estadiamento TNM, $p<0,001$

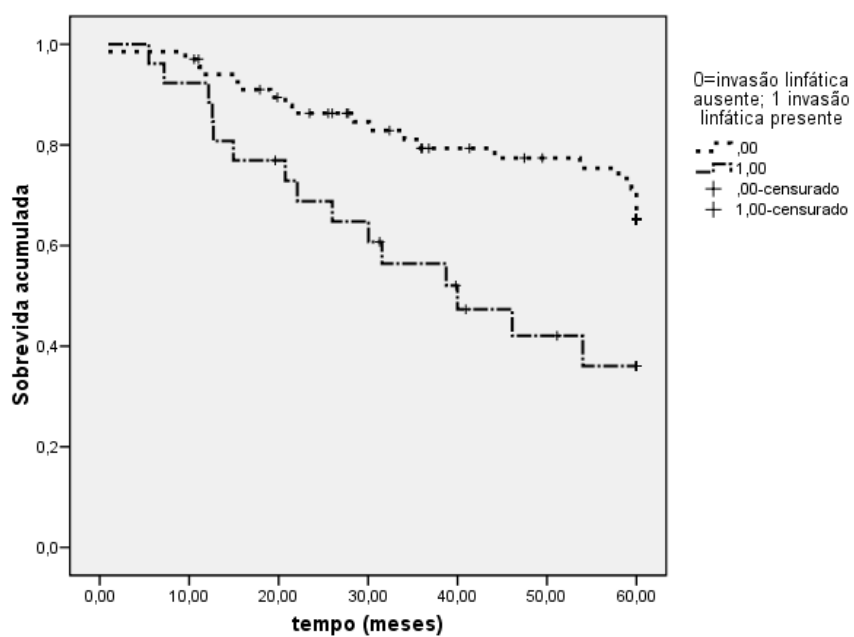


Figura 26: Curva de sobrevivência em relação à invasão linfática, $p=0,004$

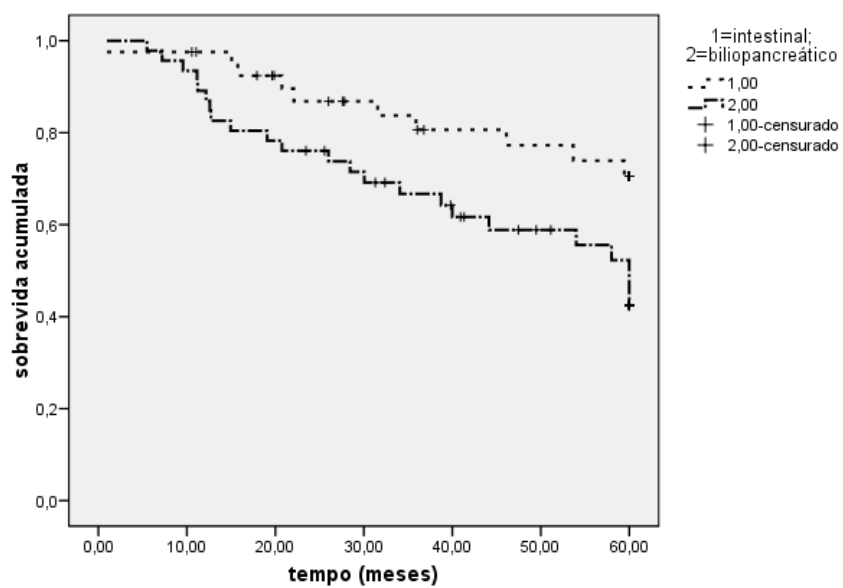


Figura 27: Curva de sobrevivência em relação ao tipo histológico, $p=0,021$

Realizamos então a análise pelo modelo de risco proporcional com cura (proportional hazard with cure). Exerceram influência independente no prognóstico o acometimento linfonodal e a invasão linfática (Tabela 27).

Tabela 27: Modelo de risco proporcional com cura

Fator	Risco relativo	IC 95%	P
Acometimento linfonodal	4,12	2,17; 7,82	<0,001
Invasão linfática	2,31	1,19; 4,49	0,013
Tipo histológico pancreatobiliar	1,08	0,13; 9,59	0,801

Foi observado que realmente há uma fração de cura ($p = 0.070$). Pacientes com linfonodos acometidos apresentam uma chance de óbito igual a 4,12 [IC 95%; 2,17; 7,82] vezes a dos pacientes sem linfonodos. Já os casos com invasão linfática apresentam uma chance de óbito igual a 2,31 [IC 95%: 1,19; 4,49] vezes a dos pacientes sem invasão linfática. O tipo histológico pancreatobiliar não se relacionou com pior sobrevivência em análise multivariada.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

A discussão é apresentada em duas partes; a primeira refere-se à casuística e ao método empregado e suas limitações e na segunda parte consideram-se os resultados relativos aos marcadores imunoistoquímicos para determinação da origem tecidual e marcadores de alterações genéticas e instabilidade de microssatélites

5.1. Casuística e método empregado

O carcinoma da ampola de Vater pode originar-se da mucosa duodenal que recobre a ampola, do epitélio do canal pancreatobiliar comum, do epitélio do ducto biliar distal, ou do epitélio do ducto pancreático distal. Assim, apresenta espectro de diferentes neoplasias, relacionadas à diferentes origens teciduais, evolução diversa, merecendo provavelmente tratamentos diferenciados.

Na prática, há uma dificuldade em se determinar o tecido histológico de origem devido a heterogeneidade histológica dos tumores, a falta de uma nomenclatura universal, e a presença de lesões pré-neoplásicas acompanhando carcinomas invasivos em mais de um sítio (20).

O AAV, embora pouco frequente, apresenta maiores índices de ressecabilidade que os adenocarcinomas do pâncreas, o que nos permite analisar uma séria relativamente ampla de doentes com tumores ressecados com intenção curativa. Dessa forma, é possível analisar os resultados em função da sobrevivência.

Este estudo pretendeu incluir todos os AAVs operados num longo período de tempo, a fim de possibilitar a análise de sobrevivência. Uma de suas limitações é que, devido à raridade desse tumor, os casos foram estudados na grande maioria de forma retrospectiva, através da análise de prontuários. Apenas a partir de 2003 pudemos fazer um seguimento prospectivo através de banco de dados informatizado do Serviço de Vias Biliares e Pâncreas.

No entanto, um dado de grande relevância no estudo refere-se à anatomia-patológica. Este dado foi rigorosamente revisado para o estudo por dois patologistas experientes, com leitura das lâminas antigas e confecção de novas lâminas, a partir dos blocos de parafina.

O seguimento dos doentes é fator crítico já que não é realizado de forma planejada em nossa instituição. Trinta e dois doentes dos 35 vivos até o momento são acompanhados ambulatorialmente. Alguns óbitos ocorreram na instituição, constando informações em prontuário, outros foram confirmados através do atestado de óbito arquivado do SVOC (Serviço de Verificação de Óbitos da Capital). Embora tenha se procurado máxima exatidão nos dados relativos ao óbito, é possível que ocorram falhas já que algumas informações foram prestadas por familiares. Devido a esses fatores, realizamos apenas análise de sobrevivência

global, e não sobrevivência livre de doença. Houve perda de seguimento em 14 casos, sendo sete antes de cinco anos.

Finalmente, não foi possível controlar o tratamento recebido após a ressecção; alguns pacientes receberam quimioterapia, o que pode influenciar a sobrevivência. No entanto, atualmente não há dados na literatura que suportem o benefício do tratamento adjuvante nesta patologia.(123, 124)

Técnica de imunoistoquímica e uso do *tissue microarray*

A técnica de imunoistoquímica foi escolhida por ser bem estabelecida e empregada de rotina na prática clínica (125), o que torna fácil a aplicação dos resultados obtidos.

A técnica de “tissue microarray” foi baseada nos trabalhos de Kononen *et al* (126) e propicia a racionalização de custos e de tempo despendidos no estudo de cortes histológicos, seja corados por H&E ou submetidos à métodos imunoistoquímicos, com comprovada acurácia e validação dos resultados das análises em diversos estudos prévios (127-132).

A aplicabilidade do TMA para antígenos relacionados à instabilidade de microssatélites pode ser considerada mais delicada, já que a anormalidade é a não expressão dos marcadores. Para evitar falsos negativos devido a falhas técnicas, todos os casos negativos no TMA (21 casos) foram revisados na lâmina completa.

Essa revisão encontrou cinco falsos negativos no TMA, um para MLH1 e quatro para MSH2.

5.2. Discussão relativa aos resultados

5.2.1 Marcadores imunoistoquímicos para diferenciação do epitélio de origem

A primeira classificação dos AAV em tipo intestinal e pancreatobiliar foi feita por Kimura *et al* em 1994 (19). Examinando 53 casos, eles descreveram características anatomopatológicas que podiam dividi-los em TI e TPB. Observou-se que os tumores classificados como TI apresentavam melhor prognóstico e menos metástases linfonodais.

Somente em 2000 Albores-Saavedra definiu as características anatomopatológicas que classificariam esses dois tipos de AAV, além de outros tipos de adenocarcinomas, menos comuns (20). Essa classificação ainda é empregada atualmente e foi utilizada como base para a definição de TI e TPB em nosso estudo.

A classificação histológica dos AAV em TI e TPB tornou-se necessária para comparação de terapêuticas clínicas e estudos prognósticos para esses tumores. Na

casuística do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center com 140 casos de AAVs, o TI correspondeu a 49% e o TPB a 22% dos casos (20). De 55 casos estudados por Zhou *et al*, 44% foram classificados como TPB, 27% como TI e 29% como tipos incomuns ou mistos. Já Roh *et al* publicaram em 2007 34 casos, 64,7% TPB e 35,35% TI (34).

Em tese de livre docência defendida por Jukemura J, foram analisados histologicamente 97 casos desta casuística (35). Os tumores foram classificados por patologista experiente, sendo 44,3% do TI, 48,5% do TPB e 7,2% de tipos incomuns. Verificou-se maiores índices de acometimento linfonodal, estádios mais avançados, invasão linfática e perineural no TPB. Além disso, os pacientes com TI apresentaram maior sobrevivência (35).

Usando os critérios anatomopatológicos descritos por Albores-Saavedra (20), patologistas especializados são capazes de classificar os subtipos tumorais (intestinal e pancreatobiliar) em cerca de 90% dos casos (133). Em muitos casos o fenótipo não é uniforme. Além disso, muitas vezes é difícil diferenciar os AAV de outros tumores periampulares, principalmente nos materiais de biópsia. A fim de melhor caracterizar os tipos tumorais, iniciaram então os estudos utilizando imunoexpressão. Entretanto, os painéis de marcadores utilizados não são uniformes. Alguns utilizaram apenas citoqueratinas (32), outros apenas apomucinas (4), outros painéis mistos com marcadores diversos (34, 74).

Em nosso estudo foi realizado um painel amplo incluindo todos os marcadores já testados previamente para AAVs (CK7, CK17, CK20, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDX2) e CD10.

Os marcadores que apresentaram frequência de positividade significativa maior para o TI foram o MUC2, o CK20, o CD10 e o CDX2 e para o TPB, MUC1 e CK7. O CDX2 foi aquele que apresentou melhor acurácia (82,2%). Os marcadores do TPB apresentaram boa sensibilidade, porém uma especificidade baixa por terem sido positivos em vários casos do TI. Aplicando-se um modelo de regressão logística, concluímos que a associação de marcadores com maior capacidade de predizer o tipo histológico é composta pelo CDX2, MUC2 e MUC1. Além disso, este estudo mostrou que o CDX2+, mesmo quando utilizado isoladamente, determina uma possibilidade 16 vezes maior de o tumor ser TI que TPB. A associação MUC2+/MUC1- aumenta essa possibilidade em mais de 19 vezes.

Aplicando-se essa associação de marcadores foi possível classificar os 7 carcinomas incomus, com possibilidade de acerto superior à 80%. Pudemos também reclassificar todos os AAVs utilizando apenas esses três marcadores imunoistoquímicos. Essa nova classificação apresentou uma ótima concordância com a classificação histológica (coeficiente $k = 0,702$). Para os TIs a concordância foi de 90% e para os TPBs de 80%.

Zhou *et al* utilizaram apenas a combinação CK7/CK20 para classificar os AAVs. Houve uma boa concordância entre o TPB e expressão CK7+/CK20-, de 87,5%. Entretanto, a expressão CK7-/CK20+ concordou em apenas 60% para os TIs e apenas 4 dos 16 tumores ditos mistos puderam ser classificados (32).

As mucinas foram utilizadas inicialmente por Matsubayashi *et al* numa série de 52 casos, incluindo 23 AAV, 24 adenomas com carcinoma e 5 adenomas (4). Os

tumores TI apresentaram maior frequência de componente tumoral intraductal, presença de componente adenomatoso e expressão de MUC2, em relação do TPB (4). Outro estudo associou o MUC2 e CK7/CK20, com diferença significativa entre TI e TPB para os três marcadores. Porém, as citoqueratinas apresentaram especificidade mais baixa(5). Chu *et al* também demonstraram que a expressão de MUC2 e CDX2 associam-se ao fenótipo intestinal enquanto que MUC1 e CK17 associaram-se ao pancreatobiliar (3).

A expressão de CK17 em nosso estudo foi um pouco mais frequente nos AAVs TPB, porém sem diferença significativa em relação ao TI. Entretanto, expressão de CK17 em adenocarcinomas não mucinosos extra-pancreáticos é rara, e nunca de forma difusa (3).

Em nossa série, o MUC5AC esteve expresso em cerca de 70% dos casos de AAV, pouco mais frequente no TPB. Já a expressão de MUC6 ocorreu de forma similar nos dois grupos, em cerca de 44% dos casos. Esses dois marcadores são expressos normalmente na mucosa gástrica (134) e quando expressos em tumores duodenais ou AAV caracterizam uma diferenciação gástrica, com origem molecular diferente daqueles com diferenciação intestinal (134). Essa distinção ainda não foi bem estudada, merecendo melhores estudos no futuro.

Algumas séries associaram a expressão de MUC5AC com origem pancreatobiliar (32, 120, 135). A expressão MUC1+/MUC5AC+ é característica de adenocarcinomas pancreáticos e colangiocarcinomas, ocorrendo apenas em alguns casos de adenocarcinomas esofágicos, gástricos e de colo uterino (136). Já a

coexpressão de MUC1+, MUC5AC+ e CK17+ é um perfil único de adenocarcinomas pancreatobiliares e não ocorre em nenhum outro adenocarcinoma (3).

Parece haver uma relação entre o MUC5AC e fatores protetores da ampola de Vater. Curiosamente, os AAVs que expressam MUC5AC são encontrados muito mais frequentemente no segmento ductal pancreático da ampola que no biliar. Assim, especula-se que o suco pancreático tenha influência no desenvolvimento desses carcinomas (4, 10).

O CDX2 já havia sido demonstrado como um bom marcador para adenocarcinomas de origem intestinal (74, 120). Hansel *et al* (74) examinaram uma série com 53 AAV e demonstraram que a expressão de CDX2 isoladamente poderia identificar os TIs, além de estar associado a um melhor prognóstico, sugerindo que esse marcador poderia ser usado como fator independente de evolução. Recentemente, Sessa *et al* (120) verificaram 100% de expressão desses marcadores nos seus AAV classificados como TI, porém, assim como em nossa série, não comprovou a associação direta entre expressão de CDX2 e melhor sobrevivência.

Sabe-se que o CDX2 está relacionado com a manutenção da diferenciação do epitélio intestinal colônico (67, 69) e a perda de sua expressão está associada com a carcinogênese do câncer colônico (67). Já no câncer gástrico, a expressão de CDX2 está associada a melhor prognóstico e relaciona-se com a presença de metaplasia intestinal no epitélio do estômago (137). Sua expressão nos AAV sugere origem do epitélio duodenal, entretanto, foi verificada ocorrência desse marcador em alguns tumores pancreáticos e de vias biliares (74). Em nosso estudo, a expressão nos AAV

TPB ocorreu em 21,3% dos casos. Assim, a analogia CDX2 e tipo intestinal não é absoluta. Também é verdade que nem todo adenocarcinoma de origem intestinal expressa CDX2, e assim como para o câncer colorretal, a perda da expressão de CDX2 pode fazer parte do processo de carcinogênese dos AAV (138)

Analisando a relação dos marcadores para determinação do tipo histológico e critérios anatomopatológicos, é interessante notar a relação entre positividade para MUC1 e tumores bem diferenciados e, inversamente, MUC2 e tumores pouco diferenciados. Sessa *et al* (120) buscaram essa associação entre diferenciação tumoral e marcadores, verificando uma frequência maior de tumores bem diferenciados e expressão de CDX2, porém sem significância estatística.

A análise da expressão do CD10 nos AAV é inédita neste estudo. Este marcador teve expressão significativamente maior nos TIs (81,4% versus 51,1%). O CD10 está relacionado a células secretoras de muco e no pâncreas é útil no diagnóstico diferencial entre cistoadenomas mucinosos e neoplasia sólida pseudopapilar, onde a expressão ocorre na maioria dos casos, dos adenomas mucinosos papilíferos intraductais, nos quais não ocorre expressão (41).

A indefectível diferença na expressão de marcadores imunoistoquímicos parece comprovar a origem tecidual diferente para os dois tipos histológicos de AAV. Sustentando essa teoria, Ho *et al* (139) relataram que os genes de mucinas são regulados independentemente e que suas expressões são órgão e tipo celular específicas. Além disso, é possível que a maioria dos AAVs TI originem-se de

adenomas enquanto que os TPB originam-se das regiões ductais pancreatobiliares, incluindo o canal comum, podendo haver exceções (4).

Na tumorigênese intestinal, não apenas no cólon e reto (140), como no delgado (141) e na ampola de Vater (10 à 91% dos casos) (12, 142, 143), a sequência adenoma-carcinoma foi proposta. Mais de 95% dos tumores benignos da papila são adenomas do tipo intestinal (5) e nos adenocarcinomas TI, a presença de componente adenomatoso ocorre em 90% dos casos (4), sugerindo essa origem tumoral. Na verdade, lesões precursoras podem originar-se tanto da mucosa tipo intestinal quanto da mucosa do segmento pancreático e biliar, conservando características de expressões de citoqueratinas e mucinas desses tecidos (5). Entretanto, nos AAV TPB a evidência de lesões precursoras é mais rara, podendo ser evidenciado por lesão intraductal pancreática associada (4, 144).

O prognóstico dos AAVs depende do estadió, acometimento linfonodal e diferenciação histológica (14, 27, 30, 35, 145-147). Em nosso estudo, apenas o acometimento linfonodal e a invasão linfática foram fatores independentes relacionados ao prognóstico.

A influência do tipo histológico é de difícil determinação devido à grande variância de terminologias e métodos classificatórios (20). O tipo histológico intestinal esteve relacionado com melhor sobrevivência em nosso estudo em análise univariada, porém não conseguimos provar diferença utilizando a classificação imunoistoquímica ou mesmo a expressão de qualquer marcador. O tipo intestinal apresentou melhor sobrevivência em algumas séries publicadas (19,

20, 33, 34, 117), não verificada em outros estudos (3, 32). Na maioria das casuísticas nas quais o TPB associou-se à pior sobrevivência, esses tumores estavam relacionados à maior acometimento linfonodal e estadios mais avançados (19, 20, 35).

A expressão de alguns marcadores relacionados ao tipo intestinal já estiveram relacionados a um melhor prognóstico nos AAVs, como CDX2 (74) e MUC2 (148). Porém, outros estudos não conseguiram comprovar essa relação (3, 32).

Finalmente, a diferença de expressão das mucinas MUC2 e MUC1 e do CDX2 parece consistente entre adenocarcinomas ampulares TI e TPB. Esses marcadores devem ser usados de forma auxiliar aos achados anatomopatológico no diagnóstico diferencial dos AAVs. Embora pareça haver um melhor prognóstico associado ao tipo intestinal, não conseguimos comprovar uma relação entre sobrevivência e perfil imunoistoquímico.

5.2.2 Marcadores imunoistoquímicos relacionados à carcinogênese

p53, p16 e Ki67

Neste estudo, 35 pacientes (36,1%) com AAV apresentaram expressão de p53 nos AAVs. Houve relação de p53 com neoplasias pouco diferenciadas e

presença de invasão linfática. Não verificamos diferença na expressão do p53 entre os TI e TPB.

Em outras séries, a frequência de mutação do p53 variou entre 13% e 46% (93-97). A mutação do p53 esteve associada à transformação de adenomas e carcinomas de baixo grau em carcinomas de alto grau (94, 97, 117). Outros estudos relacionaram essa mutação com metástase linfonodal e estadios mais avançados (94, 95). Já a relação dessa expressão com tipos histológicos intestinal e pancreatobiliar não foi demonstrada (97).

O papel da mutação do p53 na carcinogênese já foi estudado nos mais diversos carcinomas. No carcinoma ductal do pâncreas, por exemplo, a mutação do p53 foi relacionada à evolução neoplásica, uma vez que sua ocorrência é mais frequente em estadios avançados e aumenta progressivamente da displasia para o carcinoma (92).

No AAV também já foi demonstrado o caráter evolutivo da mutação do p53 durante a transformação maligna do adenoma para carcinoma, mas a maioria dos estudos falharam ao tentar correlacionar a expressão do p53 com menor sobrevivência (94, 95, 149, 150), assim como em nosso estudo. Apenas dois estudos relataram uma pior evolução nos tumores com expressão do p53 (94, 151), ainda que apenas em análise univariada.

A expressão do p16 ocorreu em 30,6% dos AAVs desse estudo. Este marcador não apresentou relação com sobrevivência nem com os diferentes tipos histológicos. Moore *et al* (152) encontraram boa correlação entre análise genética com

imunoistoquímica, com 25% de mutação do p16 em AAVs. Já Ueki *et al* (101) verificaram 70,6% de alteração do p16 em AAVs em análise genética, porém sem confirmação de imunoexpressão, e sem relação com pior sobrevivência.

Em estudo recente foi demonstrado que tanto no câncer pancreático quanto no AAV, a perda de heterozigotidade para o p16 está relacionado à maior agressividade tumoral e pior sobrevivência (153). Porém, essa alteração pode não determinar a expressão da proteína p16 no tecido tumoral. Novos estudos comparando alterações genéticas e imunoperoxidase poderão responder qual o real papel do p16 como marcador tecidual.

O Ki67 foi expresso em 37% dos AAVs desse estudo, considerando positivos casos com expressão em mais de 10% das células. Embora não encontrássemos pior sobrevivência para doentes que o expressaram pela análise de sobrevivência pelo método de log-rank, houve relação entre pacientes com sobrevivência curta e expressão desse marcador em relação àqueles com sobrevivência prolongada.

O Ki67 já havia sido demonstrado como um indicador prognóstico para o câncer de mama (154) e pulmão (155). Vaidya *et al* também compararam pacientes operados por AAV com curta e longa sobrevivência em relação aos índices de Ki67, encontrando significativamente maiores expressões no primeiro grupo (156). Por ser um bom marcador de proliferação celular, o Ki67 parece ser um marcador prognóstico não órgão específico.

Instabilidade de microssatélites

A instabilidade de microssatélites (IMS) geralmente é estudada através da extração de DNA e análise de sequências de genes (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1, hPMS2). Outro gene analisado é o BAT-26, cuja mutação é o marcador mais sensível para detecção de tumores com fenótipo de IMS (157). Para confirmar a instabilidade, é possível analisar a expressão de enzimas codificadas por esses genes nos tecidos, através do uso de anticorpos para hMLH1, hMSH2 e hMSH6.

Neste estudo foi realizado apenas a imunoistoquímica para avaliar a perda de expressão das proteínas de reparo do DNA (MMR), já que vários estudos demonstraram alta sensibilidade e especificidade da não expressão desses marcadores e a presença de IMS (158-165).

Não há até o momento um estudo amplo utilizando imunoistoquímica para determinar a presença de IMS nas neoplasias ampulares e sua relação com fatores clínicos, anatomopatológicos e sobrevivência. Neste contexto, a nossa série é a primeira a realizar um painel imunoistoquímico para caracterizar a expressão das proteínas de reparo do DNA nos AAV.

A falta de expressão de pelo menos uma proteína de reparo ocorreu em 13,6% (13/97) dos casos estudados. Apenas um caso apresentou associação de perda de expressão para as três proteínas testadas, e um para duas. Embora não tenha sido comprovada melhor sobrevivência nos pacientes com IMS, na análise comparativa entre doentes com sobrevivência breve e longa, esse foi um fator significativo.

Os resultados relativos à IMS são pouco concordantes na literatura. Utilizando sequenciamento gênico, Park *et al* encontraram uma frequência de 34,6% de IMS em 1 a 3 dinucleotídeos dos nove testados nos adenomas de ampola de Vater, 28,1% nos carcinomas e 10% nas lesões metastáticas de AAVs (118). Nenhum caso apresentava mutação do BAT-26 e também não houve perda de imunexpressão tecidual para anticorpos anti-hMLH1 e hMLH2 nos tecidos tumorais de nenhum dos casos.

Em um estudo de Imai *et al*, 77,8% do AAVs apresentaram mutações na sequência do gene TGFBR1 (166). Já Suto *et al* encontraram 12,5% de IMS em 16 casos estudados, não verificando relação dessa alteração com critérios anatomopatológicos ou prognóstico (167). Achille *et al* estudaram 25 AAV e encontraram 20% de IMS (117). Esses tumores estiveram associados a um melhor prognóstico e embora sem significância estatística, eram mais frequentemente pouco diferenciados e com menos metástases linfonodais. Em nosso estudo a IMS foi também mais frequente nos tumores pouco diferenciados (21,4% versus 13,3% nos moderadamente diferenciados e 9,1% nos bem diferenciados) e com ausência de metástase linfonodal (15,9% versus 9,1% dos pacientes com metástases linfonodais). Esses achados são semelhantes aos verificados para o carcinoma colorretal (168).

Nos adenocarcinomas pancreáticos, a IMS é muito menos frequente que no AAV. Em uma série com 82 carcinomas ductais descritos por Goggins *et al*, apenas 3 apresentaram erros de replicação do DNA (169), sendo todos pouco diferenciados e

do tipo medular. A fim de melhor caracterizar esses tumores, Wilentz *et al* estudaram geneticamente 21 casos de carcinomas medulares; encontrando 23% de IMS (170). Num estudo incluindo apenas carcinomas ductais mucinosos, selecionados pela expressão de MUC1 e MUC2, nenhum dos 11 casos apresentaram IMS (171). No cólon, carcinomas mucinosos com expressão de MUC2 apresentam frequentemente IMS (172). Nas neoplasias intraductais papilíferos mucinosos, a IMS foi verificada em apenas 10% dos casos(173).

Em estudo também utilizando apenas imunoistoquímica, Sessa *et al* encontraram uma frequência de 9,5% de IMS em 53 AAVs, confirmados pela ausência de expressão de pelo menos 2 das proteínas hMLH1, hMSH2, hMSH6 e hPMS2 (120). Os 5 casos com IMS apresentavam histologia compatível com TI, expressavam CDX2 e apresentaram melhor sobrevivência que os demais.

Já foi demonstrada a relação de IMS com melhor prognóstico para o câncer gástrico (174), colorretal (113) e mama (175). No AAV, apenas Scarpa *et al* conseguiram verificar essa relação (117). Isso se deve provavelmente devido à baixa frequência de IMS no AAV e ao pequeno número de casos na maioria das séries.

Um estudo de perfis genéticos do AAVs revelou duas possíveis vias de alterações (117). O primeiro grupo de tumores foi caracterizado por alterações de K-ras, p53, p16, assim como perdas de alelos nos cromossomos 3p, 5q, 17p e 18q, alterações geralmente verificadas na sequência adenoma-carcinoma e semelhantes àquelas dos carcinomas colorretais. O segundo grupo caracterizou-se por altos níveis de instabilidade de microsatélites e mutações do gene TGF-BRII, alterações

características do chamado caminho do fenótipo-mutado (117). Esse grupo estaria associado a um melhor prognóstico. Embora ainda não haja comprovação indubitável desta hipótese, poderíamos supor que os AAVs TI estariam relacionados com a segunda via e os TPB, com a primeira.

Até o momento, os estudos de IMS são controversos e incluem em sua maioria um número limitado de casos. Nossa frequência está de acordo com o estudo publicado mais recentemente (120), assim como melhor prognóstico desses casos. Porém, não conseguimos provar a associação dessa alteração com o tipo histológico intestinal.

CEA e CA19-9

O carcinoma antígeno embrionário (CEA) é expresso nos tecidos endodermais durante os dois primeiros trimestres da vida fetal e também nos carcinomas gastrointestinais e alguns tumores de origem epitelial, como pâncreas, mama, pulmão, ovário e tireóide. Como sua expressão no tecido normal é negligenciável, sua expressão é utilizada como marcador tumoral na prática clínica.

Neste estudo, o CEA foi expresso em 79% dos AAV, e esteve relacionado significativamente com a expressão de p16, CA19-9 e CDX2. Kimura *et al* analisaram a expressão de CEA na ampola de Vater e verificaram que no tecido normal ou com atipia leve esse marcador nunca é expresso. Na atipia moderada ou grave essa expressão ocorreu em 4,3% dos casos, e nos carcinomas em 78,6% (176). Hasleton

et al sugeriram que a expressão de CEA no citoplasma das células de adenomas poderia ser um índice de malignização na papila de Vater (177).

Em estudo comparativo entre carcinomas duodenais e ampulares, essa expressão foi de 73% e 63%, respectivamente (95). Assim como em nossa série, não houve correlação com estadiamento e grau histológico. Zhou *et al* verificaram que o CEA esteve significativamente mais expresso nos AAVs TI (32). Em nosso estudo, a positividade do CEA foi maior no TI (83,7% versus 76,6%), porém sem significância estatística.

O CA19-9 foi expresso em 88% dos tecidos de AAV neste estudo. O antígeno CA19-9 normalmente é encontrado em concentrações aumentadas em dosagens séricas de pacientes com carcinoma pancreático (178). Kimura *et al* estudaram a expressão de CA19-9 nos adenomas com atipia e nos carcinomas da ampola de Vater, verificando 87% e 64,3% de expressão, respectivamente (176). Entretanto, estudos imunoistoquímicos demonstraram que este marcador está expresso também nos ductos e células acinares do pâncreas normal (176, 179). Assim, poderíamos supor que este marcador estaria mais expresso no AAV TPB. Embora o TPB tenha expressado com mais frequência o CA19-9 (93,6% versus 83,7% TI), essa diferença não foi significativa.

Kamisawa *et al* estudaram 24 AAV, e verificaram um pior prognóstico para pacientes com CEA e CA19-9 positivos. Entretanto, em sua série, a positividade desses marcadores foi menor que 50%, diferentemente dos resultados de séries

mais recente (180). Neste trabalho, a expressão de CEA e CA19-9 não foi distinta entre TI e TPB, tão pouco esteve relacionada com prognóstico dos AAVs.

6. Conclusões

6- CONCLUSÕES

Com base na casuística e metodologia empregada, podemos concluir:

1. A utilização dos marcadores CDX2, MUC2 e MUC1 associados permite classificar com maior acurácia os AAVs em tipo intestinal e pancreatobiliar.
2. O CDX2 é o marcador de tumores de origem intestinal com maior sensibilidade e especificidade quando utilizado de forma isolada.
3. A expressão do p53 está relacionada a carcinomas menos diferenciados e com invasão linfática e a expressão do Ki67 está relacionada com óbito precoce nos doentes operados por AAV.
4. p16, CEA e CA19-9 não relacionaram-se com critérios clínicos e anatomopatológicos.
5. A perda de expressão de proteínas relacionadas à instabilidade de microssatélites ocorreu em 13,5% dos casos e está relacionada com sobrevivência superior a 5 anos nos doentes operados por AAV.
6. Nenhum dos marcadores relacionados à carcinogênese permite diferenciar os AAV TI e TPB.
7. Das variáveis anátomo-patológicas estudadas, apenas o acometimento linfonodal e a invasão linfática apresentaram relação com menor sobrevivência em 5 anos.

8. Nenhum marcador estudado apresentou relação com a sobrevivência.

7- Anexos

7. ANEXOS

Anexo A: Classificação TNM de acordo com a *Union International Contra Le Cancer* (UICC), de 2002

Tabela A1: Classificação TNM de acordo com a *Union International Contra Le Cancer* (UICC), de 2002.

T	Tumor primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado à ampola de Vater ou ao esfíncter de Oddi
T2	Tumor que invade a parede duodenal
T3	Tumor que invade pâncreas
T4	Tumor que invade partes moles peri-pancreáticas, ou outros órgãos ou estruturas adjacentes
N	Linfonodos regionais
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodos regionais
M	Metástase à distância
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

pTNM - Classificação Patológica

As categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M.

pN0 O exame histológico do espécime de uma linfadenectomia regional incluirá, geralmente, 10 ou mais linfonodos. Se os linfonodos são negativos, mesmo que o número usualmente examinado seja não encontrado, classifica-se como pN0.

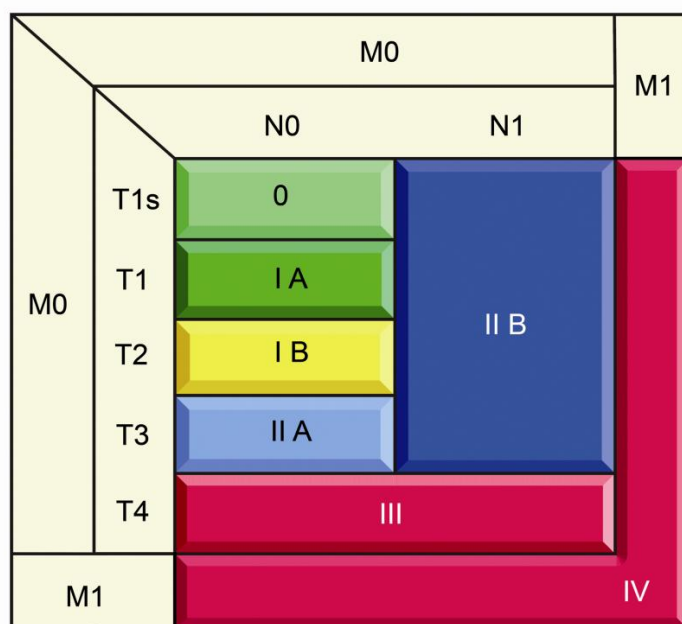


Figura A1: Grupamento por estadios nas neoplasias de ampola de Vater

8- Referências

8. REFERÊNCIAS

1. Ishibashi Y, Murakami G, Honma T, Sato TJ, Takahashi M. Morphometric study of the sphincter of oddi (hepatopancreatic) and configuration of the submucosal portion of the sphincteric muscle mass. *Clin Anat*. 2000;13(3):159-67.
2. Kunath U, Hommerding H. [Is the duodenal papilla an autonomic sphincter? A contribution to the functional morphology (author's transl)]. *Res Exp Med (Berl)*. 1981;178(2):103-16.
3. Chu PG, Schwarz RE, Lau SK, Yen Y, Weiss LM. Immunohistochemical staining in the diagnosis of pancreatobiliary and ampulla of Vater adenocarcinoma: application of CDX2, CK17, MUC1, and MUC2. *Am J Surg Pathol*. 2005 Mar;29(3):359-67.
4. Matsubayashi H, Watanabe H, Yamaguchi T, Ajioka Y, Nishikura K, Kijima H, *et al*. Differences in mucus and K-ras mutation in relation to phenotypes of tumors of the papilla of vater. *Cancer*. 1999 Aug 15;86(4):596-607.
5. Fischer HP, Zhou H. Pathogenesis of carcinoma of the papilla of Vater. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2004;11(5):301-9.
6. Kim RD, Kundhal PS, McGilvray ID, Cattral MS, Taylor B, Langer B, *et al*. Predictors of failure after pancreaticoduodenectomy for ampullary carcinoma. *J Am Coll Surg*. 2006 Jan;202(1):112-9.
7. Yamaguchi K, Enjoji M. Carcinoma of the ampulla of vater. A clinicopathologic study and pathologic staging of 109 cases of carcinoma and 5 cases of adenoma. *Cancer*. 1987 Feb 1;59(3):506-15.
8. Nakase A, Matsumoto Y, Uchida K, Honjo I. Surgical treatment of cancer of the pancreas and the periampullary region: cumulative results in 57 institutions in Japan. *Ann Surg*. 1977 Jan;185(1):52-7.
9. Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, *et al*. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg*. 1997 Sep;226(3):248-57; discussion 57-60.
10. Fischer HP, Zhou H. [Pathogenesis and histomorphology of ampullary carcinomas and their precursor lesions. Review and individual findings]. *Pathologe*. 2003 May;24(3):196-203.
11. Paulsen FP, Bobka T, Tsokos M, Folsch UR, Tillmann BN. Functional anatomy of the papilla Vateri: biomechanical aspects and impact of difficult endoscopic intubation. *Surg Endosc*. 2002 Feb;16(2):296-301.
12. Howe JR, Klimstra DS, Moccia RD, Conlon KC, Brennan MF. Factors predictive of survival in ampullary carcinoma. *Ann Surg*. 1998 Jul;228(1):87-94.
13. Bettschart V, Rahman MQ, Engelken FJ, Madhavan KK, Parks RW, Garden OJ. Presentation, treatment and outcome in patients with ampullary tumours. *Br J Surg*. 2004 Dec;91(12):1600-7.
14. Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Hruban RH, Lillemoe KD, Pitt HA. Periampullary adenocarcinoma: analysis of 5-year survivors. *Ann Surg*. 1998 Jun;227(6):821-31.
15. Warren KW, Choe DS, Plaza J, Relihan M. Results of radical resection for periampullary cancer. *Ann Surg*. 1975 May;181(5):534-40.
16. Cohen JR, Kuchta N, Geller N, Shires GT, Dineen P. Pancreaticoduodenectomy. A 40-year experience. *Ann Surg*. 1982 May;195(5):608-17.

17. Tarazi RY, Hermann RE, Vogt DP, Hoerr SO, Esselstyn CB, Jr., Cooperman AM, *et al.* Results of surgical treatment of periampullary tumors: a thirty-five-year experience. *Surgery*. 1986 Oct;100(4):716-23.
18. Michelassi F, Erroi F, Dawson PJ, Pietrabissa A, Noda S, Handcock M, *et al.* Experience with 647 consecutive tumors of the duodenum, ampulla, head of the pancreas, and distal common bile duct. *Ann Surg*. 1989 Oct;210(4):544-54; discussion 54-6.
19. Kimura W, Futakawa N, Yamagata S, Wada Y, Kuroda A, Muto T, *et al.* Different clinicopathologic findings in two histologic types of carcinoma of papilla of Vater. *Jpn J Cancer Res*. 1994 Feb;85(2):161-6.
20. Albores-Saavedra J. Tumors of the gallbladder, extrahepatic bile ducts, and ampulla of Vater. In: Albores-Saavedra J, editor. *Atlas of Tumor Pathology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 2000. p. 259:316.
21. Diener MK, Knaebel HP, Heukaufer C, Antes G, Buchler MW, Seiler CM. A systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus classical pancreaticoduodenectomy for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Ann Surg*. 2007 Feb;245(2):187-200.
22. Park YC, Kim SW, Jang JY, Ahn YJ, Park YH. Factors influencing delayed gastric emptying after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *J Am Coll Surg*. 2003 Jun;196(6):859-65.
23. Roder JD, Stein HJ, Huttli W, Siewert JR. Pylorus-preserving versus standard pancreaticoduodenectomy: an analysis of 110 pancreatic and periampullary carcinomas. *Br J Surg*. 1992 Feb;79(2):152-5.
24. Pratt WB, Maithel SK, Vanounou T, Huang ZS, Callery MP, Vollmer CM, Jr. Clinical and economic validation of the International Study Group of Pancreatic Fistula (ISGPF) classification scheme. *Ann Surg*. 2007 Mar;245(3):443-51.
25. Brown KM, Tompkins AJ, Yong S, Aranha GV, Shoup M. Pancreaticoduodenectomy is curative in the majority of patients with node-negative ampullary cancer. *Arch Surg*. 2005 Jun;140(6):529-32; discussion 32-3.
26. Qiao QL, Zhao YG, Ye ML, Yang YM, Zhao JX, Huang YT, *et al.* Carcinoma of the ampulla of Vater: factors influencing long-term survival of 127 patients with resection. *World J Surg*. 2007 Jan;31(1):137-43; discussion 44-6.
27. Beger HG, Treitschke F, Gansauge F, Harada N, Hiki N, Mattfeldt T. Tumor of the ampulla of Vater: experience with local or radical resection in 171 consecutively treated patients. *Arch Surg*. 1999 May;134(5):526-32.
28. Woo SM, Ryu JK, Lee SH, Yoo JW, Park JK, Kim YT, *et al.* Recurrence and prognostic factors of ampullary carcinoma after radical resection: comparison with distal extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007 Nov;14(11):3195-201.
29. Allema JH, Reinders ME, van Gulik TM, van Leeuwen DJ, Verbeek PC, de Wit LT, *et al.* Results of pancreaticoduodenectomy for ampullary carcinoma and analysis of prognostic factors for survival. *Surgery*. 1995 Mar;117(3):247-53.
30. Monson JR, Donohue JH, McEntee GP, McIlrath DC, van Heerden JA, Shorter RG, *et al.* Radical resection for carcinoma of the ampulla of Vater. *Arch Surg*. 1991 Mar;126(3):353-7.
31. Balachandran P, Sikora SS, Kapoor S, Krishnani N, Kumar A, Saxena R, *et al.* Long-term survival and recurrence patterns in ampullary cancer. *Pancreas*. 2006 May;32(4):390-5.
32. Zhou H, Schaefer N, Wolff M, Fischer HP. Carcinoma of the ampulla of Vater: comparative histologic/immunohistochemical classification and follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2004 Jul;28(7):875-82.

33. Westgaard A, Tafjord S, Farstad IN, Cvancarova M, Eide TJ, Mathisen O, *et al.* Pancreatobiliary versus intestinal histologic type of differentiation is an independent prognostic factor in resected perampullary adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2008;8:170.
34. Roh YH, Kim YH, Lee HW, Kim SJ, Roh MS, Jeong JS, *et al.* The clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of ampulla of Vater carcinoma: the intestinal type is associated with a better prognosis. *Hepatogastroenterology*. 2007 Sep;54(78):1641-4.
35. Jukemura J. Influência do tipo histológico na sobrevivência tardia dos doentes com adenocarcinoma de ampola de Vater tratados cirurgicamente. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
36. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*. 2000 Sep;13(9):962-72.
37. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov;31(1):11-24.
38. Wauters CC, Smedts F, Gerrits LG, Bosman FT, Ramaekers FC. Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. *Hum Pathol*. 1995 Aug;26(8):852-5.
39. Lagendijk JH, Mullink H, Van Diest PJ, Meijer GA, Meijer CJ. Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry: differential diagnosis between colonic and ovarian carcinomas as primary sites. *Hum Pathol*. 1998 May;29(5):491-7.
40. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002 May;40(5):403-39.
41. Handra-Luca A, Flejou JF, Rufat P, Corcos O, Belghiti J, Ruzsniowski P, *et al.* Human pancreatic mucinous cystadenoma is characterized by distinct mucin, cytokeratin and CD10 expression compared with intraductal papillary-mucinous adenoma. *Histopathology*. 2006 Jun;48(7):813-21.
42. McCluggage WG, Wilkinson N. Metastatic neoplasms involving the ovary: a review with an emphasis on morphological and immunohistochemical features. *Histopathology*. 2005 Sep;47(3):231-47.
43. Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, Seidman JD, *et al.* Cytokeratins 7 and 20 in primary and secondary mucinous tumors of the ovary: analysis of coordinate immunohistochemical expression profiles and staining distribution in 179 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006 Sep;30(9):1130-9.
44. Miettinen M. Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls. *Pathol Annu*. 1993;28 Pt 2:113-43.
45. Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol*. 2003 May;16(5):403-10.
46. Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci*. 2002 Mar;27(3):126-31.
47. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*. 2001 Oct 1;6:D1192-206.
48. Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee. HUGO/GNC.: Available from: <http://www.hugo-international.org/hugo/>.
49. Kim GE, Bae HI, Park HU, Kuan SF, Crawley SC, Ho JJ, *et al.* Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1052-60.

50. Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*. 2000 Oct;47(4):589-94.
51. Terada T, Ohta T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Expression of MUC apomucins in normal pancreas and pancreatic tumours. *J Pathol*. 1996 Oct;180(2):160-5.
52. Giorgadze TA, Peterman H, Baloch ZW, Furth EE, Pasha T, Shiina N, *et al*. Diagnostic utility of mucin profile in fine-needle aspiration specimens of the pancreas: an immunohistochemical study with surgical pathology correlation. *Cancer*. 2006 Jun 25;108(3):186-97.
53. Kim YS, Gum JR, Jr., Crawley SC, Deng G, Ho JJ. Mucin gene and antigen expression in biliopancreatic carcinogenesis. *Ann Oncol*. 1999;10 Suppl 4:51-5.
54. Yonezawa S, Horinouchi M, Osako M, Kubo M, Takao S, Arimura Y, *et al*. Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor. *Pathol Int*. 1999 Jan;49(1):45-54.
55. Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, *et al*. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2002 May;117(5):791-6.
56. Ho JJ, Han SW, Pan PL, Deng G, Kuan SF, Kim YS. Methylation status of promoters and expression of MUC2 and MUC5AC mucins in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2003 Feb;22(2):273-9.
57. Paulsen FP, Varoga D, Paulsen AR, Corfield A, Tsokos M. Prognostic value of mucins in the classification of ampullary carcinomas. *Hum Pathol*. 2006 Feb;37(2):160-7.
58. Bonner CA, Loftus SK, Wasmuth JJ. Isolation, characterization, and precise physical localization of human CDX1, a caudal-type homeobox gene. *Genomics*. 1995 Jul 20;28(2):206-11.
59. Drummond F, Putt W, Fox M, Edwards YH. Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene. *Ann Hum Genet*. 1997 Sep;61(Pt 5):393-400.
60. Hong SM, Cho H, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr., Yu E, Ro JY. CDX2 and MUC2 protein expression in extrahepatic bile duct carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2005 Sep;124(3):361-70.
61. Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB. Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7318-23.
62. Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature*. 1997 Mar 6;386(6620):84-7.
63. Tamai Y, Nakajima R, Ishikawa T, Takaku K, Seldin MF, Taketo MM. Colonic hamartoma development by anomalous duplication in Cdx2 knockout mice. *Cancer Res*. 1999 Jun 15;59(12):2965-70.
64. Wicking C, Simms LA, Evans T, Walsh M, Chawengsaksophak K, Beck F, *et al*. CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene*. 1998 Aug 6;17(5):657-9.
65. Sivagnanasundaram S, Islam I, Talbot I, Drummond F, Walters JR, Edwards YH. The homeobox gene CDX2 in colorectal carcinoma: a genetic analysis. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2):218-25.
66. Yagi OK, Akiyama Y, Yuasa Y. Genomic structure and alterations of homeobox gene CDX2 in colorectal carcinomas. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(3-4):440-4.

67. Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, *et al.* Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):14030-6.
68. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, *et al.* Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol.* 2001 Dec;159(6):2239-48.
69. Almeida R, Silva E, Santos-Silva F, Silberg DG, Wang J, De Bolos C, *et al.* Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol.* 2003 Jan;199(1):36-40.
70. Bai YQ, Yamamoto H, Akiyama Y, Tanaka H, Takizawa T, Koike M, *et al.* Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Lett.* 2002 Feb 8;176(1):47-55.
71. Shi XY, Bhagwande B, Leong AS. CDX2 and villin are useful markers of intestinal metaplasia in the diagnosis of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol.* 2008 Apr;129(4):571-7.
72. Jin T, Drucker DJ. Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein cdx-2/3. *Mol Cell Biol.* 1996 Jan;16(1):19-28.
73. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003 Mar;27(3):303-10.
74. Hansel DE, Maitra A, Lin JW, Goggins M, Argani P, Yeo CJ, *et al.* Expression of the caudal-type homeodomain transcription factors CDX 1/2 and outcome in carcinomas of the ampulla of Vater. *J Clin Oncol.* 2005 Mar 20;23(9):1811-8.
75. Barbareschi M, Murer B, Colby TV, Chilosi M, Macri E, Loda M, *et al.* CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol.* 2003 Feb;27(2):141-9.
76. Chang YT, Hsu C, Jeng YM, Chang MC, Wei SC, Wong JM. Expression of the caudal-type homeodomain transcription factor CDX2 is related to clinical outcome in biliary tract carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Mar;22(3):389-94.
77. McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, Anderson JJ, *et al.* NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol.* 1999 Jan;154(1):77-82.
78. Chu PG, Chang KL, Weiss LM, Arber DA. Immunohistochemical detection of CD10 in paraffin sections of hematopoietic neoplasms: a comparison with flow cytometry detection in 56 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000 Dec;8(4):257-62.
79. LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)--emancipation from a functional enigma. *Blood.* 1989 Feb 15;73(3):625-35.
80. Erhuma M, Kobel M, Mustafa T, Wulfanger J, Dralle H, Hoang-Vu C, *et al.* Expression of neutral endopeptidase (NEP/CD10) on pancreatic tumor cell lines, pancreatitis and pancreatic tumor tissues. *Int J Cancer.* 2007 Jun 1;120(11):2393-400.
81. Notohara K, Hamazaki S, Tsukayama C, Nakamoto S, Kawabata K, Mizobuchi K, *et al.* Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: immunohistochemical localization of neuroendocrine markers and CD10. *Am J Surg Pathol.* 2000 Oct;24(10):1361-71.
82. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
83. Hsi ED. The search for meaningful prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2001 Apr;115(4):481-3.

84. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11.
85. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989 Dec 7;342(6250):705-8.
86. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer. *Recent Results Cancer Res.* 1998;154:22-36.
87. Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, *et al.* Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 2003 Mar 10;104(1):60-5.
88. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, *et al.* p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood.* 1993 Oct 1;82(7):1994-2004.
89. Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES, *et al.* Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1997 Jan 15;89(2):601-9.
90. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, *et al.* K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res.* 1994 Mar 15;54(6):1556-60.
91. DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, *et al.* Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol.* 1994 Jun;101(6):684-8.
92. Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, *et al.* Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005 Nov 21;11(43):6765-9.
93. Rashid A, Ueki T, Gao YT, Houlihan PS, Wallace C, Wang BS, *et al.* K-ras mutation, p53 overexpression, and microsatellite instability in biliary tract cancers: a population-based study in China. *Clin Cancer Res.* 2002 Oct;8(10):3156-63.
94. Park SH, Kim YI, Park YH, Kim SW, Kim KW, Kim YT, *et al.* Clinicopathologic correlation of p53 protein overexpression in adenoma and carcinoma of the ampulla of Vater. *World J Surg.* 2000 Jan;24(1):54-9.
95. Zhu L, Kim K, Domenico DR, Appert HE, Howard JM. Adenocarcinoma of duodenum and ampulla of Vater: clinicopathology study and expression of p53, c-neu, TGF-alpha, CEA, and EMA. *J Surg Oncol.* 1996 Feb;61(2):100-5.
96. Lee CS, Pirdas A. p53 protein immunoreactivity in cancers of the gallbladder, extrahepatic bile ducts and ampulla of Vater. *Pathology.* 1995 Apr;27(2):117-20.
97. Zhao B, Kimura W, Futakawa N, Muto T, Kubota K, Harihara Y, *et al.* p53 and p21/Waf1 protein expression and K-ras codon 12 mutation in carcinoma of the papilla of Vater. *Am J Gastroenterol.* 1999 Aug;94(8):2128-34.
98. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):42-55.
99. Chen Q, Luo G, Li B, Samaranayake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 1999 Apr;28(4):158-64.
100. Hahn SA, Schmiegel WH. Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion.* 1998 Aug;59(5):493-501.

101. Ueki T, Hsing AW, Gao YT, Wang BS, Shen MC, Cheng J, *et al.* Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 1;10(5):1717-25.
102. Martin AR, Chan WC, Perry DA, Greiner TC, Weisenburger DD. Aggressive natural killer cell lymphoma of the small intestine. *Mod Pathol.* 1995 Jun;8(5):467-72.
103. Lelle RJ. [In situ determination of the Ki-67 growth fraction (Ki-67 GF) in human tumors (studies in breast cancer)]. *Acta Histochem Suppl.* 1990;39:109-24.
104. Shibata N, Watari J, Fujiya M, Tanno S, Saitoh Y, Kohgo Y. Cell kinetics and genetic instabilities in differentiated type early gastric cancers with different mucin phenotype. *Hum Pathol.* 2003 Jan;34(1):32-40.
105. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999 Apr;9(2):67-81.
106. Maxwell P. Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker. *Br J Biomed Sci.* 1999;56(3):209-14.
107. Ugorski M, Laskowska A. Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochim Pol.* 2002;49(2):303-11.
108. Nishida K, Tasaki N, Miyagawa H, Yoshikawa T, Kondo M. Estimation of carbohydrate antigen (CA) 19-9 levels in pure pancreatic juice of patients with pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol.* 1988 Feb;83(2):126-9.
109. Hamanaka Y, Hamanaka S, Suzuki M. Sialyl Lewis(a) ganglioside in pancreatic cancer tissue correlates with the serum CA 19-9 level. *Pancreas.* 1996 Aug;13(2):160-5.
110. Boeck S, Stieber P, Holdenrieder S, Wilkowski R, Heinemann V. Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer. *Oncology.* 2006;70(4):255-64.
111. Malesci A, Montorsi M, Mariani A, Santambrogio R, Bonato C, Bissi O, *et al.* Clinical utility of the serum CA 19-9 test for diagnosing pancreatic carcinoma in symptomatic patients: a prospective study. *Pancreas.* 1992;7(4):497-502.
112. Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, *et al.* Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer.* 2001 Nov 20;95(6):350-3.
113. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
114. Lynch HT, Fusaro RM, Sandberg AA, Bixenman HA, Johnsen LR, Lynch JF, *et al.* Chromosome instability and the FAMMM syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993 Nov;71(1):27-39.
115. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159-70.
116. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67.
117. Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G, Iacono C, Talamini G, *et al.* Cancers of the papilla of Vater: mutator phenotype is associated with good prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997 Oct;3(10):1841-7.
118. Park S, Kim SW, Kim SH, Darwish NS, Kim WH. Lack of microsatellite instability in neoplasms of ampulla of Vater. *Pathol Int.* 2003 Oct;53(10):667-70.

119. Scarpa A, Di Pace C, Talamini G, Falconi M, Lemoine NR, Iacono C, *et al.* Cancer of the ampulla of Vater: chromosome 17p allelic loss is associated with poor prognosis. *Gut*. 2000 Jun;46(6):842-8.
120. Sessa F, Furlan D, Zampatti C, Carnevali I, Franzi F, Capella C. Prognostic factors for ampullary adenocarcinomas: tumor stage, tumor histology, tumor location, immunohistochemistry and microsatellite instability. *Virchows Arch*. 2007 Sep;451(3):649-57.
121. Machado MC, da Cunha JE, Bacchella T, Bove P. A modified technique for the reconstruction of the alimentary tract after pancreatoduodenectomy. *Surg Gynecol Obstet*. 1976 Aug;143(2):271-2.
122. Chareton B, Coiffic J, Landen S, Bardaxoglou E, Champion JP, Launois B. Diagnosis and therapy for ampullary tumors: 63 cases. *World J Surg*. 1996 Jul-Aug;20(6):707-12.
123. Klinkenbijnl JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, *et al.* Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg*. 1999 Dec;230(6):776-82; discussion 82-4.
124. Bhatia S, Miller RC, Haddock MG, Donohue JH, Krishnan S. Adjuvant therapy for ampullary carcinomas: the Mayo Clinic experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Oct 1;66(2):514-9.
125. Alves VAF BC, Vassallo J. . Manual de imunoistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
126. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7.
127. Boone J, van Hillegersberg R, van Diest PJ, Offerhaus GJ, Rinkes IH, Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Virchows Arch*. 2008 May;452(5):507-14.
128. Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol*. 2001 Jan;8(1):14-20.
129. Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology*. 2003 Jan;42(1):70-6.
130. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Biotechniques*. 2004 Jan;36(1):98-105.
131. Lee HW, Park YR, Sim J, Park RW, Kim WH, Kim JH. The tissue microarray object model: a data model for storage, analysis, and exchange of tissue microarray experimental data. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Jul;130(7):1004-13.
132. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol*. 2008 Feb;19(1):19-25.
133. Carter JT, Grenert JP, Rubenstein L, Stewart L, Way LW. Tumors of the ampulla of vater: histopathologic classification and predictors of survival. *J Am Coll Surg*. 2008 Aug;207(2):210-8.
134. Gurbuz Y, Kloppel G. Differentiation pathways in duodenal and ampullary carcinomas: a comparative study on mucin and trefoil peptide expression, including gastric and colon carcinomas. *Virchows Arch*. 2004 Jun;444(6):536-41.
135. Sanada Y, Yoshida K, Konishi K, Oeda M, Ohara M, Tsutani Y. Expression of gastric mucin MUC5AC and gastric transcription factor SOX2 in ampulla of vater adenocarcinoma:

- comparison between expression patterns and histologic subtypes. *Oncol Rep.* 2006 May;15(5):1157-61.
136. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 2004 Jul;122(1):61-9.
137. Mizoshita T, Tsukamoto T, Nakanishi H, Inada K, Ogasawara N, Joh T, *et al.* Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003 Dec;129(12):727-34.
138. Ee HC, Erler T, Bhathal PS, Young GP, James RJ. Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am J Pathol.* 1995 Sep;147(3):586-92.
139. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, *et al.* Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1993 Feb 1;53(3):641-51.
140. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1;319(9):525-32.
141. Perzin KH, Bridge MF. Adenomas of the small intestine: a clinicopathologic review of 51 cases and a study of their relationship to carcinoma. *Cancer.* 1981 Aug 1;48(3):799-819.
142. Tasaka K. Carcinoma in the region of the duodenal papilla. A histopathologic study (author's transl)]. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 1977 Jan;68(1):20-44.
143. Baczako K, Buchler M, Beger HG, Kirkpatrick CJ, Haferkamp O. Morphogenesis and possible precursor lesions of invasive carcinoma of the papilla of Vater: epithelial dysplasia and adenoma. *Hum Pathol.* 1985 Mar;16(3):305-10.
144. Agoff SN, Crispin DA, Bronner MP, Dail DH, Hawes SE, Haggitt RC. Neoplasms of the ampulla of vater with concurrent pancreatic intraductal neoplasia: a histological and molecular study. *Mod Pathol.* 2001 Mar;14(3):139-46.
145. Klempnauer J, Ridder GJ, Pichlmayr R. Prognostic factors after resection of ampullary carcinoma: multivariate survival analysis in comparison with ductal cancer of the pancreatic head. *Br J Surg.* 1995 Dec;82(12):1686-91.
146. Talbot IC, Neoptolemos JP, Shaw DE, Carr-Locke D. The histopathology and staging of carcinoma of the ampulla of Vater. *Histopathology.* 1988 Feb;12(2):155-65.
147. Talamini MA, Moesinger RC, Pitt HA, Sohn TA, Hruban RH, Lillemoe KD, *et al.* Adenocarcinoma of the ampulla of Vater. A 28-year experience. *Ann Surg.* 1997 May;225(5):590-9; discussion 9-600.
148. Kitamura H, Yonezawa S, Tanaka S, Kim YS, Sato E. Expression of mucin carbohydrates and core proteins in carcinomas of the ampulla of Vater: their relationship to prognosis. *Jpn J Cancer Res.* 1996 Jun;87(6):631-40.
149. Ajiki T, Kamigaki T, Hasegawa Y, Fujino Y, Suzuki Y, Takeyama Y, *et al.* Proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-erbB-2 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in cancer of the ampulla of Vater. *Hepatogastroenterology.* 2001 Sep-Oct;48(41):1266-70.
150. Takashima M, Ueki T, Nagai E, Yao T, Yamaguchi K, Tanaka M, *et al.* Carcinoma of the ampulla of Vater associated with or without adenoma: a clinicopathologic analysis of 198 cases with reference to p53 and Ki-67 immunohistochemical expressions. *Mod Pathol.* 2000 Dec;13(12):1300-7.

151. Santini D, Tonini G, Vecchio FM, Borzomati D, Vincenzi B, Valeri S, *et al.* Prognostic value of Bax, Bcl-2, p53, and TUNEL staining in patients with radically resected ampullary carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005 Feb;58(2):159-65.
152. Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, Capelli P, Rigaud G, Falconi M, *et al.* Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2001 Jan;84(2):253-62.
153. Franko J, Krasinskas AM, Nikiforova MN, Zarnescu NO, Lee KK, Hughes SJ, *et al.* Loss of heterozygosity predicts poor survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2008 Oct;12(10):1664-72; discussion 72-3.
154. Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer.* 1991 Jan 15;67(2):421-8.
155. Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology.* 1991 Dec;19(6):545-50.
156. Vaidya P, Yosida T, Sakakura T, Yatani R, Noguchi T, Kawarada Y. Combined analysis of expression of c-erbB-2, Ki-67 antigen, and tenascin provides a better prognostic indicator of carcinoma of the papilla of Vater. *Pancreas.* 1996 Mar;12(2):196-201.
157. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, *et al.* Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 Feb;21(2):101-7.
158. Lucci-Cordisco E, Boccuto L, Neri G, Genuardi M. The use of microsatellite instability, immunohistochemistry and other variables in determining the clinical significance of MLH1 and MSH2 unclassified variants in Lynch syndrome. *Cancer Biomark.* 2006;2(1-2):11-27.
159. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, *et al.* Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol.* 1999 Oct;23(10):1248-55.
160. Staebler A, Lax SF, Ellenson LH. Altered expression of hMLH1 and hMSH2 protein in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2000 Mar;31(3):354-8.
161. Fogt F, Zimmerman RL, Poremba C, Noffsinger AE, Alsaigh N, Rueschoff J. Immunohistochemical screening of mismatch repair genes hMLH1, hMSH2, and hMSH6 in dysplastic lesions of the colon. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002 Mar;10(1):57-61.
162. Skarda J, Fridman E, Plevova P, Hajduch M, Radova L, Ofek E, *et al.* Prognostic value of hMLH1 and hMSH2 immunohistochemical expression in non-small cell lung cancer. A tissue microarray study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006 Nov;150(2):255-9.
163. Kassem HS, Varley JM, Hamam SM, Margison GP. Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in bladder cancer. *Br J Cancer.* 2001 Feb 2;84(3):321-8.
164. Geisler JP, Geisler HE, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z, Crabtree W. Immunohistochemical staining of the mismatch repair gene, hMSH2, and survival in patients with ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2000;21(3):237-40.
165. Manavis J, Gilham P, Davies R, Ruszkiewicz A. The immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2): practical aspects in antigen retrieval and biotin blocking protocols. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003 Mar;11(1):73-7.

-
166. Imai Y, Tsurutani N, Oda H, Inoue T, Ishikawa T. Genetic instability and mutation of the TGF-beta-receptor-II gene in ampullary carcinomas. *Int J Cancer*. 1998 May 4;76(3):407-11.
167. Suto T, Habano W, Sugai T, Uesugi N, Kanno S, Saito K, *et al*. Infrequent microsatellite instability in biliary tract cancer. *J Surg Oncol*. 2001 Feb;76(2):121-6.
168. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1994 Jul;145(1):148-56.
169. Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D, *et al*. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol*. 1998 Jun;152(6):1501-7.
170. Wilentz RE, Goggins M, Redston M, Marcus VA, Adsay NV, Sohn TA, *et al*. Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol*. 2000 May;156(5):1641-51.
171. Luttges J, Beyser K, Pust S, Paulus A, Ruschoff J, Kloppel G. Pancreatic mucinous noncystic (colloid) carcinomas and intraductal papillary mucinous carcinomas are usually microsatellite stable. *Mod Pathol*. 2003 Jun;16(6):537-42.
172. Biemer-Huttmann AE, Walsh MD, McGuckin MA, Simms LA, Young J, Leggett BA, *et al*. Mucin core protein expression in colorectal cancers with high levels of microsatellite instability indicates a novel pathway of morphogenesis. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1909-16.
173. Nakata B, Yashiro M, Nishioka N, Aya M, Yamada S, Takenaka C, *et al*. Very low incidence of microsatellite instability in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Int J Cancer*. 2002 Dec 20;102(6):655-9.
174. dos Santos NR, Seruca R, Constancia M, Seixas M, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology*. 1996 Jan;110(1):38-44.
175. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res*. 1996 Sep 1;56(17):4021-6.
176. Kimura W, Ohtsubo K. Incidence, sites of origin, and immunohistochemical and histochemical characteristics of atypical epithelium and minute carcinoma of the papilla of Vater. *Cancer*. 1988 Apr 1;61(7):1394-402.
177. Hasleton PS, Shah S, Buckley CH, Tweedle DE. Ampullary carcinoma associated with multiple duodenal villous adenomas. *Am J Gastroenterol*. 1980 May;73(5):418-22.
178. Del Villano BC, Brennan S, Brock P, Bucher C, Liu V, McClure M, *et al*. Radioimmunoassay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clin Chem*. 1983 Mar;29(3):549-52.
179. Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF, Koprowski H. Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res*. 1982 Nov;42(11):4820-3.
180. Kamisawa T, Fukayama M, Koike M, Tabata I, Egawa N, Isawa T, *et al*. Carcinoma of the ampulla of Vater: expression of cancer-associated antigens inversely correlated with prognosis. *Am J Gastroenterol*. 1988 Oct;83(10):1118-23.

Apêndice

APÊNDICE 1: DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

N	RGHC	Sexo	Idade	perda peso>10%	Náuseas vômitos	Icterícia	Dor abdominal	procedimento	Data Procedimento	Hb (g/dl)	bil (g/dl)	Albumina (g/dl)
1	13501588E	F	70	não	sim	não	não	DP+VB	12/6/1999	12,9	12,9	3,90
2	2979292F	M	69	não	não	não	sim	DP+VB	4/6/2001	13,6	1	5,00
3	2198956B	M	50	sim	não	sim	não	GDP+VB	29/07/1997	13,6	5,9	3,50
4	2645364B	M	67	não	não	sim	não	DP+VB	23/02/1999	11,8	4,4	3,30
5	2992320D	M	69	sim	sim	sim	sim	GDP+VB	21/06/1994	11	2,5	3,60
6	2328936C	M	53	sim	sim	sim	sim	GDP+VB	7/10/1995	11	31,7	2,70
7	3312961E	F	67	sim	não	não	sim	GDP+VB	22/3/2004	12,6	1,1	3,90
8	3297326C	M	69	sim	não	sim	não	DP+VB	7/5/1999	13,2	12,2	3,40
9	3252307B	F	67	sim	não	sim	sim	DP+VB	8/10/1998	11,1	5,2	
10	3185797J	F	65	sim	não	sim	sim	DP	15/06/1999	11,8	19,7	3,40
11	3143460F	M	72	sim	sim	sim	não	GDP+VB	21/5/1996	13,1	33	3,00
12	3270095I	F	59	não	não	sim	não	GDP	4/1/1999	10,8	6,1	3,10
13	3290850D	M	54	sim	não	sim	sim	DP	31/08/1999	11,6	1,5	3,10
14	13613551I	M	73	sim	não	sim	não	DP+VB	1/5/2004	11,3	15,1	2,50
15	3264506A	M	54	sim	não	sim	não	DP+VB	17/11/1998	12,2	20,8	2,50
16	2872363H	F	64	sim	não	sim	não	GDP+VB	16/02/1995	14,2	2,3	3,20
17	13648633J	M	65	não	não	sim	não	DP+VB	14/9/2004	9,9	16,6	3,10
18	13529536C	M	61	não	não	não	sim	DP+VB	2/5/2001	15	0,9	3,90
19	3274648J	M	68	sim	sim	não	sim	DP	18/01/1999	10,5	0,4	
20	3164132H	M	63	sim	não	sim	não	GDP	10/10/1996	13,3	2,7	3,10
21	3117316F	M	61	sim	sim	sim	sim	DP+VB	26/12/1995	11,2	2,4	
22	3196258H	M	47	sim	não	sim	sim	GDP	10/6/1997	10,9	10	3,40
23	5196320E	M	64	sim	não	sim	sim	DP+VB	8/6/2001	10,1	1,2	3,20
24	2968517B	M	70	sim	não	não	não	GDP+VB	10/11/1994	13,7	0,4	4,20
25	2247189F	F	74	sim	sim	não	sim	DP+VB	10/6/2002	11	0,7	3,90
26	3246570J	F	39	sim	não	sim	sim	DP	16/11/1998	13,3	3,2	4,30
27	3189828F	M	52	não	não	não	não	DP+VB	8/4/1997	15,2	0,5	4,60
28	3186488H	M	53	sim	não	sim	sim	GDP+VB	4/3/1997	12,8	1,2	
29	3177983E	M	47	sim	sim	não	sim	DP	2/2/1998	15,4	0,6	4,27
30	5055967I	F	70	sim	sim	sim	sim	DP+VB	26/11/2002	11,3	1,4	3,10
31	3268609G	M	23	não	não	sim	sim	DP+VB	14/12/1998	11,7	21,6	2,90
32	3284256H	M	31	sim	sim	não	sim	DP+VB	26/07/1999	9,5	0,8	3,80
33	2983551I	M	57	sim	não	sim	sim	GDP+VB	27/06/1994	12,8	14,4	4,10
34	13687478D	F	61	sim	sim	não	não	DP+VB	16/6/1985	10,2	0,9	3,60
35	3160492I	F	68	não	não	sim	não	GDP+VB	12/8/1996	11,3	12,4	3,80
36	13480962I	M	64	sim	sim	sim	sim	DP+VB	17/03/2003	12,5	6,6	2,10
37	13605625F	F	68	não	NT	sim	sim	DP	11/4/2003	9,2	25,1	
38	13577745F	F	64	sim	não	sim	sim	DP+VB	11/6/2002	13,2	2,9	3,60
39	13520173K	M	59	sim	não	sim	não	DP+VB	13/11/2000	13,3	3	3,90
40	13520610A	F	65	não	sim	sim	sim	DP	12/12/2000	12	27,5	2,80
41	5067191K	F	65	sim	não	não	sim	DP+VB	22/10/2002	10,4	0,4	4,10
42	13487483I	F	51	sim	sim	não	sim	DP+VB	25/08/2003	15,4	0,4	4,30
43	13495146A	M	83	sim	não	não	não	DP+VB	15/7/2003	13,1	1,2	2,80
44	13627162F	F	62	não	sim	sim	não	DP+VB	13/4/2004	8,9	7,9	3,00

45	13659939C	F	38	sim	não	sim	sim	DP+VB	7/12/2004	12,6	1,3	4,10
46	2351629J	M	53	não	não	não	sim	DP	26/09/2000	15,2	0,6	4,60
47	2987402G	M	70	sim	não	não	sim	DP+VB	31/03/1997	11,6	0,7	4,00
48	3173162I	F	34	sim	sim	sim	sim	GDP+VB	12/11/1996	10,5	7	
49	3173317K	F	64	não	não	sim	não	GDP+VB	14/11/1996	12	1,8	
50	3012329J	M	68	sim	não	sim	não	GDP+VB	24/10/1995	13,2	8,7	4,10
51	2960488B	M	77	sim	não	sim	não	DP+VB	21/05/2002	10,2	1,5	3,60
52	3279736H	M	78	sim	não	sim	não	DP	15/03/1999	10,3	2,3	2,90
53	2956951G	F	49	não	sim	sim	sim	GDP+VB	5/2/1995	12,4	2,6	
54	2910101I	M	64	não	não	sim	não	GDP+VB	19/7/1993	11,4	15,8	3,30
55	13687904I	M	65	sim	não	sim	não	GDP+VB	31/5/2005	13,1	13,9	3,80
56	3369458K	F	68	sim	não	sim	sim	DP+VB	21/9/2001	10,5	3,3	3,40
57	13567544J	M	68	sim	não	sim	não	DP+VB	3/1/2002	11,6	48,5	2,80
58	13681185B	F	68	não	não	sim	sim	DP+VB	26/9/2006			
59	3313905C	M	72	sim	não	sim	sim	DP+VB	20/12/1999	12,5	1,9	2,90
60	13602156I	M	61	não				DP	5/5/2005	11,1	3,3	3,70
61	2910303J	M	39	não		sim		GDP+VB	6/6/1993	11	5,7	3,90
62	13676766H	M	32	sim	não	sim	sim	DP+VB	12/4/2005	11,9	0,8	3,70
63	13692377F	M	42	sim	não	sim	não	DP+VB	28/6/2005	7,3	17	2,90
64	13658975K	M	45	sim	não	sim	sim	DP+VB	25/11/2004	14,4	1,2	4,40
65	2548538B	F	53	não	sim	sim	sim	GDP	27/8/1992	10,3	2,3	2,90
66	13662384B	F	69	não				DP+VB	28/12/2004	11,3	1,6	3,90
67	2901806J	M	63	sim	sim	sim	sim	GDP+VB	8/3/1993	13,9	7,2	1,80
68	13450895H	F	79	sim	não	sim	não	DP+VB	18/7/2002	12,8	2,5	4,00
69	2860694B	M	60	sim	sim	sim	sim	DP+VB	30/7/1992	12,4	10,1	3,90
70	2818636H	F	59	sim	não	sim	sim	GDP+VB	7/4/1992	11	2,5	3,90
71	13732448F	M	58			sim		DP+VB	23/5/2006	12,6	8,2	2,40
72	2012970J	F	58	sim	não	sim	não	GDP	17/12/1982	12,4	7,2	
73	2750911H	M	34					GDP+VB	1/1/1990			
74	2535416B	F	41	não	sim	sim	sim	GDP	29/6/1988	10,5	28	4,40
75	2510431E	M	33	sim	não	sim	sim	GDP	4/12/1987	12	15,6	4,20
76	13663461B	M	69					DP	9/9/2005	13,6	0,9	3,10
77	13757874C	M	46					DP+VB	7/11/2006	14,6	0,4	4,30
78	2815893K	F	77					GDP+VB	4/11/1991			
79	2792144E	M	60					GDP	1/7/1991			
80	13746393G	F	74	não	não	não	não	DP	8/8/2006	10,7	0,8	4,10
81	13719096H	M	54	sim	não	sim	não	DP+VB	17/1/2006	10,3	28,1	2,80
82	2298291E	M	30	sim	não	sim	sim	GDP	26/9/1983	10	5	3,80
83	2531845I	M	55	não	não	sim	sim	DP+VB	20/3/2006	9,6	1,5	3,50
84	2767233I	F	59					GDP	1/6/1992	11		4,20
85	2945535C	M	55	sim	não	sim	não	GDP+VB	13/7/1981	9,7	27,9	2,40
86	2091036I	F	47	sim	sim	não	sim	GDP+VB	15/7/1985	9,9	0,6	3,80
87	13739854K	F	71					DP+VB	11/7/2006	14,4	2,7	2,60
88	2683556C	F	44	sim	sim	sim	sim	GDP	21/2/1990			
89	3338226I	2	78		sim	sim	sim	DP+VB	16/6/2000	8,9	7,1	2,50
90	2506500I	M	62	não	não	não	2	DP+VB	10/1/2006	13,3	2,3	4,10
91	2804319E	2	58	sim	sim	sim	sim	GDP+VB	12/12/1991	10,3		3,20
92	13725124H	2	57			sim		DP+VB	9/5/2006	12,6	0,3	4,20

93	13784253I	M	64	não	não	sim	sim	DP+VB	19/6/2007	8,9	1,9	4,40
94	13784346E	M	67	não	não	não	sim	DP+VB	4/6/2007	13,9	0,6	3,50
95	2414399C	2	69			sim	não	GDP	30/12/1985	12,1	9,2	
96	2071719G	M	39			sim	não	GDP+VB	12/1/1979	12.4	19	3,4
97	2485469E	M	76			sim	não	DP	27/5/1987	13,6	13,7	

LEGENDA:

RGHC; registro geral do Hospital das Clínicas

Sexo: M, masculino; F, feminino

Procedimento: DP, duodenopancreatectomia; VB, colecistectomia; GDP, gastroduodenopancreatectomia

%, por cento

Hb, hemoglobina

Bil, bilirrubina

g/dl, gramas por decilitro

APÊNDICE 2: DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

N	Diag. patológico	tipo histológico	Tam	Gânglios positivos	Gânglios Dissecados	Grau dif	Inv Vasc	Inv Linf	Inv Neur	estadio	TNM
1	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,0	1	14	mod	0	0	0	T2N1	IIB
2	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,5	0	10	mod	0	0	1	T3N1	IIB
3	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,3	0	22	mod	0	1	0	T3N0	IIA
4	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,0	0	6	mod	0	0	0	T1N0	IA
5	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,0	0	22	mod	1	1	0	T3N0	IIA
6	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	6	28	mod	0	1	1	T3N1	IIB
7	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,0	0	17	mod	0	0	1	T3N0	IIA
8	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,0	0	20	mod	0	0	0	T1N0	IA
9	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,5	1	11	mod	0	1	1	T3N1	IIB
10	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	0	13	mod	0	1	0	T3N0	IIA
11	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,0	0	10	mod	0	0	0	T1N0	IA
12	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,7	0	15	mod	0	1	0	T3N0	IIA
13	adenocarcinoma	padrão intestinal	8,0	1	20	mod	0	0	0	T2N1	IIB
14	adenocarcinoma	padrão intestinal	0,7	0	5	mod	0	1	0	T3N0	IIA
15	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,5	4	6	pouco	0	1	1	T3N1	IIB
16	adenocarcinoma	mucinoso	3,0	0	13	mod	0	1	1	T3N0	IIA
17	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,5	1	12	pouco	0	1	0	T3N1	IIB
18	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,5	0	11	mod	0	0	1	T3N0	IIA
19	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	4,0	6	9	mod	0	0	1	T3N1	IIB
20	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,8	10	15	mod	1	1	1	T3N1	IIB
21	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,3	0	19	mod	0	0	0	T1N0	IA
22	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,0	0	26	pouco	0	1	1	T3N0	IIA
23	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,5	0	13	bem	0	0	0	T2N0	IB
24	adenocarcinoma	mucinoso	3,0	0	47	bem	0	0	0	T2N0	IB
25	adenocarcinoma	mucinoso	3,0	5	16	mod	0	0	0	T2N1	IIB
26	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,5	1	1	mod	0	0	0	T2N1	IIB
27	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,9	0	23	pouco	0	0	0	T1N0	IA
28	adenocarcinoma	padrão intestinal	5,0	0	16	pouco	0	1	0	T3N0	IIA
29	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,0	0	0	bem	0	0	0	T1N0	IA
30	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	0	18	mod	0	0	0	T1N0	IA
31	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	3	22	mod	0	1	0	T3N1	IIB
32	adenocarcinoma	padrão intestinal	6,0	0	23	mod	0	0	0	T2N0	IB
33	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,4	9	16	bem	0	1	1	T3N1	IIB
34	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,2	3	4	mod	0	0	0	T1N1	IIB
35	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,5	0	15	bem	0	0	0	T2N0	IB
36	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,5	1	1	pouco	0	1	0	T3N1	IIB
37	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,0	0	4	mod	0	1	0	T3N0	IIA
38	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,4	0	17	bem	0	0	0	T1N0	IA
39	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,0	0	8	mod	0	0	0	T1N0	IA
40	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,0	0	11	mod	0	0	0	T2N0	IB
41	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,2	0	6	bem	0	0	0	T1N0	IA
42	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	0	10	bem	0	0	1	T3N0	IIA
43	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	4	26	pouco	0	1	0	T3N1	IIB
44	adenocarcinoma	mucinoso	3,5	0	16	bem	0	0	1	T3N0	IIA

45	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	0	1	mod	0	1	1	T3N0	IIA
46	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,2	0	38	mod	0	0	0	T2N0	IB
47	adenocarcinoma	padrão intestinal	4,0	6	6	mod	0	1	0	T3N1	IIB
48	adenocarcinoma	padrão intestinal	5,0	0	8	mod	0	0	0	T2N0	IB
49	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,5	0	36	mod	0	0	0	T1N0	IA
50	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	1	20	mod	0	0	1	T3N1	IIB
51	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,0	0	6	mod	1	0	1	T3N0	IIA
52	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,0	0	24	mod	0	1	0	T3N0	IIA
53	adenocarcinoma	padrão intestinal	0,3	0	10	bem	0	0	0	T1N0	IA
54	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,5	0	24	mod	0	0	0	T2N0	IB
55	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,5	0	12	mod	0	1	1	T3N0	IIA
56	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,5	0	15	bem	0	0	0	T2N0	IB
57	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	2	7	mod	1	0	1	T3N1	IIB
58	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,5	1	4	mod	0	1	1	T3N1	IIB
59	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,1	0	19	mod	0	0	0	T2N0	IB
60	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,5	0	3	bem	0	0	0	T2N0	IB
61	adenocarcinoma	adenocarcinoma	2,6	2	29	pouco	0	1	0	T3N1	IIB
62	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,5	0	18	mod	0	0	0	T2N0	IB
63	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	4,5	4	16	mod	1	1	0	T3N1M1	IV
64	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,3	1	7	mod	0	0	0	T2N1	IIB
65	adenocarcinoma	padrão intestinal	6,0	4	37	bem	0	0	0	T2N1	IIB
66	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	4,3	0	2	bem	0	0	0	T2N0	IB
67	adenocarcinoma	mucinoso	6,0	2	9	bem	0	0	0	T2N1	IIB
68	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,0	0	13	bem	0	0	0	T2N0	IB
69	adenocarcinoma	células claras	1,5	0	31	mod	0	0	0	T1N0	IA
70	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	2	21	mod	0	1	1	T3N1	IIB
71	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,3	0	0	mod	0	0	0	T2N0	IB
72	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	1	11	mod	0	0	0	T2N1	IIB
73	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	0	39	bem	0	0	0	T1N0	IA
74	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,5	0	9	mod	0	0	0	T2N0	IB
75	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	0	13	mod	0	0	0	T1N0	IA
76	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,9	3	6	pouco	0	0	0	T2N1	IIB
77	adenocarcinoma	padrão intestinal	2	0	7	mod	0	0	0	T1N0	IA
78	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,0	0	8	mod	0	0	0	T1N0	IA
79	adenocarcinoma	padrão intestinal	3,0	1	11	pouco	0	0	0	T2N1	IIB
80	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,0	0	5	mod	0	0	0	T1N0	IA
81	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,0	0	8	mod	0	0	0	T1N0	IA
82	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,0	1	5	mod	0	0	0	T1N1	IIB
83	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	7,0	3	10	pouco	0	0	0	T2N1	IIB
84	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,0	0	38	mod	0	0	0	T1N0	IA
85	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	0	7	mod	0	0	1	T3N0	IIA
86	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,5	0	4	mod	0	0	0	T2N0	IB
87	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,0	1	11	mod	1	1	0	T3N1	IIB
88	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	0	4	mod	0	1	1	T3N0	IIA
89	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreáticos	4,5	0	3	mod	0	0	0	T2N0	IB
90	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,0	0	5	bem	0	0	0	T1N0	IA
91	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,5	1	7	bem	0	0	0	T2N1	IIB
92	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,4	0	12	bem	0	0	0	T2N0	IB

93	adenocarcinoma	padrão intestinal	2,0	0	14	bem	0	0	0	T1N0	IA
94	adenocarcinoma	padrão intestinal	1,5	0	4	bem	0	0	0	T1N0	IA
95	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	3,0	2	5	mod	0	0	0	T2N1	IIB
96	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	2,0	0	2	pouco	0	0	0	T1N0	IA
97	adenocarcinoma	padrão bilio - pancreático	1,5	0	4	mod	0	0	0	T1N0	IA

LEGENDA

Diag., diagnóstico

Tam, tamanho, diâmetro tumoral no maior eixo

Grau dif, grau de diferenciação tumoral

Inv. Vasc., invasão vascular

Inv. Linf., invasão linfática

Inv. Neur., invasão neural

TNM, vide anexo 1

APÊNDICE 3: RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNOISTOQUÍMICAS

N	MUC1	MUC2	MUC6	CK7	CK20	P53	P16	KI67	CK17	CD10	CEA	CA19-9	CDX2	MUC5AC	MLH2	MSH1	MSH6
1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1.0	1.0	1.0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
3	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1.0	1.0	1.0
4	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1.0	1.0	1.0
5	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
6	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0
7	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0
8	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0
9	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
10	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1.0	1.0	0.0
11	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0.0	1.0	0.0
12	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
13	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
14	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
15	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
16	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1.0	1.0	1.0
17	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
18	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
19	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
20	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
21	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
22	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
23	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1.0	1.0	1.0
24	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
25	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
26	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1.0	1.0	1.0
27	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1.0	1.0	0.0
28	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	0.0
29	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
30	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
31	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1		1.0	1.0
32	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
33	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
34	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
35	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	0.0
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
38	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
39	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
40	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
41	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
42	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
43	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0
44	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0

45	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1.0	1.0	1.0
46	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
47	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
48	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
49	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
50	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
51	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
52	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1.0	1.0	1.0
53	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
54	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	0.0
55	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		0.0	1.0	1.0
56	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
57	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
58	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
59	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
60	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
61	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1.0	1.0	1.0
62	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
63	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
64	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
65	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1.0	1.0	1.0
66	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
67	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
68	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
69	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
70	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0
71	1	0	0	3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
72	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0.0	1.0	1.0
73	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1.0	1.0	0.0
74	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0
75	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
76	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1		1.0	1.0	1.0
77	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
78	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1.0	1.0	1.0
79	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
80	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1.0	1.0	1.0
81	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1.0	1.0	1.0
82	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1.0	0.0	1.0
83	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1.0	1.0	1.0
84		0	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0				
85	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
86	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0.0	0.0	0.0
87	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
88	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
89	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
90	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1.0	1.0	1.0
91	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1.0	1.0	1.0
92	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1.0	1.0	1.0

93	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
94	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1.0	1.0	1.0
95	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1.0	1.0	0.0
96	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1.0	0.0	1.0
97	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1.0	1.0	1.0

LEGENDA

1= positivo

2= negativo

(conforme critérios detalhados nas páginas 37 à 39)

APÊNDICE 4: DADOS RELATIVOS À SOBREVIVÊNCIA

N	status	Data do óbito	Último Contato	Sobrevivência
1	1	01/12/03	01/12/03	53,688
2	0		05/05/08	83,079
3	1	01/06/01	01/06/01	46,126
4	1		01/02/05	71,342
5	0		05/05/08	166,59
6	1	03/01/97	03/01/97	14,926
7	0		05/05/08	49,479
8	1	01/09/04	01/09/04	63,912
9	1	01/04/04	01/04/04	65,819
10	0		17/09/03	51,123
11		OIH	09/06/96	
12	0		05/05/08	112,08
13	1	01/12/00	01/12/00	15,058
14		OIH		
15		OIH		
16	0		05/05/08	158,7
17	0		08/01/08	39,814
18	0		05/05/08	84,164
19	1	01/06/01	01/06/01	28,438
20	1	01/01/00	01/01/00	38,729
21	0		05/05/08	148,41
22	1	11/12/99	11/12/99	30,049
23	0		05/05/08	82,948
24	0		29/03/06	136,67
25	1	12/12/04	12/12/04	30,115
26	1	08/08/00	08/08/00	20,745
27	1	01/05/03	05/05/08	132,99
28	1	12/06/04	12/06/04	87,353
29	0		05/05/08	123,12
30	0		05/05/08	65,326
31	1	01/01/00	01/01/00	12,592
32	0		05/05/08	105,4
33	1	01/02/95	01/02/95	7,2
34	0		11/11/07	269,03
35	0		12/12/07	136,08
36	1	1/11/05	01/11/05	31,562
37	1	01/01/05	01/01/05	20,745
38	0		05/05/08	70,849
39	0		17/11/06	72,164
40	0		05/05/08	88,8
41	0		08/01/08	62,597
42	0		08/08/07	47,474
43	1	13/09/05	13/09/05	26,005
44	0		11/04/07	35,934

45	0		05/05/08	40,932
46	1	01/02/06	01/02/06	64,241
47	1	01/02/99	01/02/99	22,093
48	0		05/05/08	137,82
49	1	12/07/07	12/07/07	127,96
50	1	01/02/06	01/02/06	123,39
51	0		07/01/08	67,627
52	0		01/11/00	19,627
53	1	01/02/98	01/02/98	35,901
54	1	01/07/98	01/07/98	59,441
55	0		08/01/08	31,299
56	0		21/11/03	26,005
57	1	10/12/02	10/12/02	11,211
58	1	01/10/07	01/10/07	12,164
59	1	12/04/01	12/04/01	15,748
60	0		05/05/08	36,033
61	0		08/01/08	175,2
62	0		05/05/08	36,789
63	1	12/12/05	12/12/05	5,4904
64	0		05/05/08	41,326
65	1	01/05/03	01/05/03	128,19
66	0		09/09/07	32,384
67	0		08/01/08	178,16
68	0		04/01/08	65,622
69	1	15/05/94	15/05/94	21,501
70	1	01/02/05	01/02/05	153,96
71	0		05/05/08	23,441
72	1	21/08/86	21/08/86	44,153
73	1	21/01/03	21/01/03	156,76
74	1	01/05/91	01/05/91	34,06
75	0		01/02/06	218,1
76	1	01/06/04	12/04/07	19,068
77	0		05/05/08	17,918
78	1	13/07/06	13/07/06	176,38
79	1	01/09/98	01/09/98	86,104
80	1	06/09/06	06/09/06	0,9534
81	0		05/05/08	27,584
82	1	01/02/04	01/02/04	244,37
83	0		05/05/08	25,545
84	0		04/08/03	134,17
85	1	05/05/08	05/05/08	321,96
86	0		19/09/07	266,33
87	1	02/08/07	02/08/07	12,723
88	1	01/11/05	01/11/05	188,45
89	1	03/04/01	03/04/01	9,5671
90	0		05/05/08	27,814
91	1	15/11/92	15/11/92	11,145
92	0		03/01/08	19,858

93	0		05/05/08	10,553
94	0		05/05/08	11,047
95	0		05/05/08	268,34
96	1	01/03/01	01/03/01	265,78
97	0		07/01/08	247,56

LEGENDA

Status: 0, vivo; 1, óbito

OIH: óbito intra-hospitalar

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)