



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI
FARMACIE CRAIOVA

Investește în oameni !
FONDUL SOCIAL EUROPEAN
Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane
2007 – 2013

Axa prioritară 1
„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”

Domeniul major de intervenție 1.5
„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”

Titlul proiectului
"Dezvoltarea școlilor doctorale prin acordarea de burse tinerilor doctoranzi cu frecvență"

Contract nr: POSDRU/88/1.5/S/52826

Beneficiar
Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA

Teza de doctorat
-Rezumat-

*Angiogeneza în tumorile neuro-endocrine
gastrice și pancreatice*

Conducător de doctorat
Prof. univ. dr. Adrian Săftoiu

Doctorand
Radu Lucian Angelescu

Craiova, 2012

CUPRINS

INTRODUCERE.....	2
PARTEA GENERALĂ.....	3
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	3
Expresia MVD și VEGF-A în tumorile neuroendocrine gastrice.....	3
Material și metode.....	3
Rezultate și discuții.....	4
Concluzii.....	5
Expresia VEGF și EGFR în adenocarcinoame și tumori neuroendocrine pancreatice.....	5
Material și metode.....	6
Rezultate și discuții.....	6
Concluzii.....	7
Ecoendoscopia Power Doppler pentru evaluarea tumorilor neuroendocrine pancreatice.....	8
Material și metode.....	8
Rezultate și discuții.....	9
Concluzii.....	9
CONCLUZII FINALE.....	10
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	11

Introducere

Termenul de “carcinoid” (“karzinoide”) a fost pentru prima dată utilizat de către Oberdorfer în 1907 pentru a defini un anumit tip particular de tumori cu potențial malign intermediar. Actual termenul de carcinoid este sinonim cu tumoră neuroendocrină (NET).

NETs sunt tumori maligne care au originea în celulele neuroendocrine din organism. Aceste tumori produc peptide care cauzează sindroame hormonale caracteristice.

Tumorile neuroendocrine gastrice își au originea în celulele enterochromaffin-like, care produc histamină ce reglează secreția de acid gastric. Majoritatea carcinoidelor gastrice sunt acompaniate de hipergastrinemie și aclorhidrie. Rata de diagnostic al carcinoidelor gastrice a crescut o dată cu utilizarea pe scară largă a metodelor endoscopice.

Originare din sistemul neuroendocrin difuz, tumorile neuroendocrine pancreatice (PNETs) sunt tumori pancreatice rare. Pe baza manifestărilor clinice, PNETs sunt clasificate în tumori funcționale și ne-funcționale. Tumorile funcționale sunt asociate cu un sindrom clinic cauzat de secreția atopică de hormoni și includ: gastrinoame, insulinoame, glucagonoame, VIP-oame, somatostatinoame, GRF-oame, ACTH-oame, GHRH-oame (*Ehehalt et al., 2009, Metz et al., 2008*). PNETs nefuncționale sunt tumori cu diferențiere endocrină, dar fără manifestări clinice cauzate de hipersecreție hormonală (*O'Grady HL, Conlon KC, 2008*).

Angiogeneza este un fenomen crucial pentru dezvoltarea tumorilor maligne, favorizând creșterea locală și invazia tumorilor. Încă din anii 1970 când Folkman a propus acest concept, numeroși cercetători si-au propus să stabilească posibile corelații între angieneză, invazivitatea tumorală și supraviețuirea pacienților, dar și să inhibe angiogeneza ca parte a terapiei împotriva cancerului (*Folkman, 1971*).

S-a demonstrat de asemenea faptul că VEGF-A este bine exprimat la nivelul tumorilor neuroendocrine bine diferențiate, în timp ce expresia sa variază în tumorile slab diferențiate (*La Rosa et al., 2003; Couvelard et al., 2006*), dar foarte puține studii au fost realizate asupra tumorilor neuro-endocrine gastrice și pancreatice, tumori înalt vasculare. În plus, spre deosebire de alte tipuri tumorale, fenotipul hipervascular al tumorilor neuroendocrine pare să fie asociat cu un potențial metastatic scăzut și cu un prognostic favorabil.

În plus, sunt foarte puține date în literatură despre rolul ecoendoscopiei cu contrast în diagnosticul și caracterizarea PNETs. Conform datelor recent publicate, EUS Power Doppler este o metodă fezabilă pentru diagnosticul PNETs, dar are limitări în ceea ce privește diferențierea între pancreatita cronică și PNET datorită pattern-ului vascular asemănător. (*Napoleon et al., 2010*).

Societatea Europeană de Tumori Neuroendocrine (ENETS) a stabilit recent rolul EUS în diagnosticul PNET, EUS-FNA fiind obligatorie pentru diagnosticul acestor pacienți (*Atiq et al., 2011*). În plus, imunomarcarea cu cromogranină A și sinaptofizină rămâne întotdeauna necesară (*Lloyd, 2003; Bussolati et al., 2001; Klöppel et al., 2009*).

Cuvinte cheie: tumori neuroendocrine gastrice, tumori neuroendocrine pancreatice, carcinoide, VEGF, EGFR, densitate microvasculară, imunohistochimie, Real-Time PCR, ecoendoscopie, Doppler

I. PARTEA GENERALĂ

Capitolul 1, intitulat “*Tumorile neuroendocrine gastrice*”, descrie epidemiologia, clasificarea, histopatologia, stadializarea și diagnosticul tumorilor neuroendocrine gastrice.

Capitolul 2, intitulat “*Tumorile neuroendocrine pancreatice*”, descrie aspectele legate de epidemiologie, clasificarea, histopatologia, stadializarea și metode imagistice diagnostice ale tumorilor neuroendocrine pancreatice.

Capitolul 3, intitulat “*Angiogeneza în tumorile neuroendocrine gastrice și pancreatice*”, prezintă aspecte legate de angiogeneza normală și tumorală. De asemenea descrie rolul factorilor pro-angiogenetici implicați în tumorile neuroendocrine gastrointestinale.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 4. Expresia MVD și VEGF-A în tumorile neuroendocrine gastrice

În acest capitol mi-am propus să caracterizez carcinoidele gastrice din punct de vedere al densității microvasculare și nivelurilor ARNm și proteinei VEGF-A.

Material și metode

Pacienți și probe biologice. 18 pacienți diagnosticați cu tumori neuroendocrine gastrice investigați prin endoscopie digestivă superioară urmată de biopsie endoscopică la *Liverpool Royal Hospital* între 2006 și 2008 și 42 de pacienți cu mucoasă gastrică normală au fost incluși în acest studiu. Pentru analiza expresiei genice, probele au fost colectate în soluție *ARNlater* și stocate la -80°C până în momentul izolării de ARN.

Pentru evaluarea imunohistochimică a VEGF-A și MVD, probele colectate prin biopsie endoscopică de la 7 pacienți cu carcinoide gastrice (carcinoide și micro-carcinoide) și 2 pacienți control (*H. pylori* negativi) au fost incluse în studiu.

Analiza expresiei genice. ARN-ul total a fost izolat din probele biologice utilizând metoda cu TRI Reagent® (Sigma Aldrich, USA), urmată de purificarea ARN-ului utilizând kit-ul High Pure RNA Tissue Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Pentru cuantificarea ARN mesager am utilizat o tehnică Real-Time PCR cantitativ în două etape: revers-transcripția ARN-ului total în ADNc utilizând kit-ul The Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), urmată de amplificarea și cuantificarea ADNc utilizând sonde și primeri specifici pentru gena VEGF-A. GAPDH a fost utilizat drept control endogen al reacției.

Imunohistochimie. Am utilizat protocoalele standard de imunohistochimie, pe secțiuni de 4μm. Pentru expunerea antigenului am utilizat acid citric 10mM pH6 mediată de căldură pentru VEGF-A și cromogranina A, și prin expunere la proteinază K 20μg/ml la 37° pentru factorul von Willebrand. Anticorpul policlonal de iepure anti-cromogranina A, anticorpul monoclonal de șoarece anti VEGF-A, clona VG-1 (ab1316, Abcam, Cambridge, UK) și anticorpul policlonal de iepure anti factor von Willebrand (ab6994, Abcam, Cambridge, UK) au fost utilizați ca anticorpi primari.

Rezultate și discuții.

Expresia ARNm pentru VEGF-A. Nivelurile relative ale VEGF-A pentru ARNm nu au variat statistic semnificativ între carcinoidele gastrice și mucoasa gastrică normală. De asemenea, nu am observat nicio corelație între nivelurile VEGF-A și sexul pacienților, prezența *H. pylori* sau caracteristicile patologice ale carcinoidelor gastrice; în schimb, am observat o corelație puternică între expresia VEGF-A și vârsta pacienților, expresia fiind mai crescută la pacienții sub 65 de ani ($p < 0.001$, Mann-Whitney test). Am demonstrat de asemenea o corelație negativă între nivelurile VEGF-A și nivelurile feritinei ($r = -0.76$, $p = 0.04$). Astfel, subliniem rolul feritinei în reglarea expresiei VEGF-A și astfel în modularea angiogenezei.

Imunoexpresia VEGF-A și MVD. În zonele de carcinoid (cromogranin-A pozitive) am observat o creștere de 1.43 de ori a numărului de vase marcate cu anticorpul wV, față de zonele cromogranin-A negative, această diferență fiind la limita de semnificație statistică ($p = 0.06$, Mann-Whitney test).

Imunomarcarea VEGF-A a evidențiat prezența unui pattern citoplasmatic, cu distribuție omogenă. Intensitatea reacției a fost variabilă între carcinoidele gastrice și mucoasa gastrică normală, precum și în diferitele zone ale aceluiași specimen. Imunoexpresia VEGF-A a fost semnificativ crescută la nivelul carcinoidelor gastrice comparativ cu mucoasa gastrică normală ($p = 0.01$, Mann-Whitney test). Această creștere a imunoexpresiei VEGF-A se datorează în primul rând creșterii cantității de proteină produsă de fiecare celulă (imunointensitate), procentul de celule pozitive pentru VEGF-A nefiind diferit semnificativ între mucoasa gastrică tumorală și normală.

În studiul nostru, MVD a fost crescută la nivelul carcinoidelor comparativ cu mucoasa gastrică normală, iar această diferență a fost la limita semnificației statistice. În plus, nivelurile imunoexpresiei VEGF-A și densitatea microvasculară nu s-au corelat în studiul nostru. Aceasta lipsă de corelație între expresia VEGF și MVD a fost demonstrată și de alți autori (*La Rosa et al., 2003*). Rezultatele noastre susțin ipoteza conform căreia, în tumorile neuroendocrine gastrice, expresia VEGF-A nu este asociată cu progresia, invazivitatea și metastazarea, ci din contră cu un prognostic bun și potențial scăzut de metastazare al tumorii (*La Rosa et al., 2003; Kuiper et al., 2011*). De asemenea, lipsa de asociere în studiul nostru între expresia ARNm pentru VEGF-A și numărul și dimensiunea nodulilor limfatici susțin această ipoteză.

Concluzii

Nivelurile proteinei VEGF-A sunt crescute la nivelul celulelor neuroendocrine, în timp ce nicio diferență biologică sau statistică nu a fost observată între nivelurile ARNm VEGF-A între grupul de pacienți și grupul control.

Nu am observat nicio corelație între nivelurile VEGF-A și MVD. Astfel, VEGF-A este în principal implicat în menținerea arhitecturii și funcțiilor endoteliale și utilizarea sa drept marker asociat cu formarea de vase sanguine nu este fezabilă

Gastrina nu promovează transcripția genei VEGF-A, dar o reglare post-transcripțională a expresiei genice este posibilă.

Nivelurile scăzute ale feritinei, un marker al deficienței de fier din celule, este corelată cu supra-expresia VEGF-A, putând fi utilizate drept un marker seric indirect pentru estimarea angiogenezei tumorale.

Capitolul 5. Expresia VEGF și EGFR în adenocarcinoame și tumori neuroendocrine pancreatice

În acest studiu am evaluat nivelurile de expresie a ARNm cu scopul de a elucida similitudinile sau diferențele modelelor de expresie și implicațiile clinice potențiale la pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice sau maligne ale pancreasului.

Material și metodă

Lotul de pacienți. Țesutul pancreatic a fost recoltat de la 35 de pacienți investigați prin eco-endoscopie (endoscopic ultrasonography - EUS) și elastografie urmate de aspirație cu ac subțire (fine-needle aspiration - FNA) la Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie din Craiova, România, între 2009 și 2011. Probele au fost colectate în *RNAlater (Ambion)* și stocate la -80°C până la izolarea ARN-ului. Toate probele au fost examinate histo-patologic. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, iar consimțământul informat pentru investigații endoscopice, biopsie, urmate de studii moleculare a fost obținut de la toți pacienții.

Izolarea ARN total. Pentru izolarea ARN-ului total din probele recoltate am utilizat kit-ul SV Total RNA Isolation System (Promega, 2009).

qRT-PCR. Pentru a cuantifica expresia genică am utilizat tehnologia Real-Time PCR cantitativ în două etape. În prima etapă, 100 ng de ARN a fost revers-transcris în ADN complementar (ADNc), utilizând kit-ul *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. În cea de-a doua etapă am realizat reacția *Real-Time PCR utilizând TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)* cu primeri specifici și sonde *TaqMan®* pentru genele țintă și pentru gena de referință.

Rezultate și discuții

VEGF a fost exprimată în toate probele de pancreatită cronică și adenocarcinoame și în doar 62.5% din tumorile neuro-endocrine pancreatice. VEGF a fost supra-exprimit semnificativ în PDAC comparativ cu țesutul pancreatic normal ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis test). Expresia relativă a VEGF a avut tendința de creștere în PNET comparativ cu pancreasul normal, dar fără a atinge nivelul de semnificație statistică.

EGFR s-a exprimat în doar 40% din cazurile de pancreatită cronică, 76.9% din adenocarcinoame și 50% din PNET. Expresia ARNm pentru EGFR a fost semnificativ crescută în PDAC comparativ cu țesutul normal ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test). Nu au fost diferențe statistice semnificative între expresia EGFR între PNET și țesutul normal sau pancreatita cronică. În doar 25% din cazurile de PNET, EGFR a fost supra-exprimit comparativ cu țesutul normal.

În cazul adenocarcinoamelor, expresia VEGF a fost crescută în tumorile mai mici de 3 cm comparativ cu tumorile cu dimensiuni de peste 3 cm. Supraexpresia EGFR în adenocarcinoamele invazive comparativ cu adenocarcinoamele non-invazive ale pancreasului a fost de asemenea observată.

Anumite studii de imunohistochimie bazate pe probe biopsiate în timpul intervenției chirurgicale au arătat o supra-expresie a VEGF atât în PDAC, cât și în PNET, dar asocierile între expresie și prognosticul tumorii sau caracteristicile anatomo-patologice sunt încă neclare. În cazul adenocarcinoamelor pancreatice, expresia VEGF a fost asociată cu prognosticul prost (*Zhang și colab., 2002*), în timp ce în PNET nu s-a găsit nicio corelație între expresia VEGF și creșterea sau

metastazarea tumorală (*Takahashi și colab., 2007*). De asemenea, nivelurile tisulare ale VEGF măsurate prin ELISA nu au fost asociate cu caracteristicile clinico-patologice ale tumorilor sau prognosticul prost la pacienții cu PNET (*Kuiper și colab., 2011*).

În studiul nostru nivelurile ARNm pentru VEGF nu au fost asociate cu invazia tumorală, invadarea nodulilor limfatici sau metastazarea hepatică nici în tumorile neuroendocrine pancreatice, nici în adenocarcinoamele pancreatice. Pe de altă parte, expresia relativă a VEGF a fost mai mare în tumorile mici (tumori cu diametrul maxim sub 3 cm) comparativ cu tumorile mari (tumori cu diametrul maxim peste 3 cm), sugerând faptul că formarea noilor vase sanguine este un proces esențial în stadiile inițiale ale dezvoltării tumorii și devine mai puțin evident în stadiile avansate, probabil datorită necrozei sau reacției desmoplazice puternice întâlnită în adenocarcinoamele pancreatice avansate. Astfel, reducerea fenomenului de angiogeneză în anumite adenocarcinoame pancreatice avansate ar putea fi responsabilă de lipsa răspunsului la chimioterapie și/sau terapie anti-angiogenetică, care nu pot “atinge” celulele tumorale datorită scăderii formării vaselor și reacției desmoplazice intense la nivelul stromei tumorale.

EGFR are un rol important în fibroza pancreatică atât în pancreatita cronică, cât și în adenocarcinoamele pancreatice, caracterizate printr-o expansiune stromală și o depunere în exces a matrixului extracelular (ECM) care înlocuiește țesutul pancreatic. Aceasta conduce în cele din urmă la alterarea turn-over-ului ECM, producția de citokine și restricționarea fluxului sanguin (*Blaine și colab., 2009*). Restricționarea fluxului sanguin poate reprezenta un stimul pentru supra-producția de VEGF de către celulele tumorale, ipoteză susținută de asocierea între expresia VEGF și EGFR observată în studiul nostru.

Studiul nostru are câteva limitări, care includ numărul mic de pacienți, care ar fi putut influența analiza statistică. Rezultatele de expresie genică nu au putut fi corelate cu analiza imunohistochimică care este dificil de realizat pe blocuri celulare mici biopsiate prin FNA ghidată prin EUS. Cu toate acestea, evaluarea expresiei genelor VEGF și EGFR în probe recoltate prin FNA ghidată prin EUS poate reprezenta un punct forte al acestui studiu, deoarece acești markeri nu pot fi evaluați și cuantificați prin imunohistochimie sau imunocitochimie în acest tip de probe.

Concluzii

VEGF-A a fost exprimată în toate probele de pancreatită cronică și adenocarcinoame, iar expresia sa la nivelul adenocarcinoamelor pancreatice a fost semnificativ crescută comparativ cu țesutul normal.

EGFR este semnificativ supra-exprimat la nivelul adenocarcinoamelor pancreatice comparativ cu țesutul normal.

Expresia EGFR a fost corelată cu invazivitatea adenocarcinoamelor, în timp ce expresia VEGF-A a fost corelată negativ cu dimensiunea tumorii.

EGFR poate fi utilizat drept marker diagnostic asociat cu prognosticul în adenocarcinoamele pancreatice.

Corelarea studiilor de expresie genice cu studii de expresie proteică este necesară pentru a elucida prezența reglării post-transcripționale a transcripților analizați.

Capitolul 7. Ecoendoscopia Power Doppler pentru evaluarea tumorilor neuroendocrine pancreatice

Material și metodă

14 pacienți pacienții diagnosticați cu tumori neuroendocrine pancreatice evaluați prin ecoendoscopie Power Doppler la Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie din Craiova în perioada Octombrie 2007 - Decembrie 2011 au fost incluși în studiu. Biopsia cu ac fin ghidată ecoendoscopie (EUS-FNA) a fost realizată la toți pacienții la care s-a suspiciat o masă focală pancreatică.

Procedurile de ecoendoscopie Power Doppler au fost realizate utilizând un sistem liniar EUS - Pentax EG 3830 UTK cuplat cu sistemul de ecografie corespunzător - Hitachi EUB 8500 sau Hitachi Preirus.

După examinarea inițială în greyscale mode, toate examinările de ecoendoscopie au fost urmate de examinări în modulul Doppler, înainte și după administrarea de substanță de contrast. Drept substanță de contrast am utilizat 2.4 ml of *SonoVue (Bracco SpA, Milan, Italy)*.

Imaginile obținute în urma examinării ecoendoscopice au fost ulterior procesate folosind un software de analiză a imaginilor (*Image J, NIH, Bethesda, Maryland, USA*) împreună cu un plugin dezvoltat de către Departamentul de Informatică al Universității de Medicină și Farmacie din Craiova. Pe baza analizei imaginilor video obținute în cadrul examinării ecoendoscopice s-a calculat ulterior indexul de vascularizare al maselor tumorale ca fiind procentul de pixeli colorați ce au fost identificați în fiecare frame al filmului. Evaluarea filmelor înregistrate s-a făcut atât înainte cât și după administrarea de substanță de contrast, pentru o durată minimă de 10 secunde.

Pentru examenele citologice, colorațiile Giemsa și Papanicolaou au fost utilizate în faza inițială. Apoi, imunomarcarea cu sinaptofizină și cromogranina A a fost realizată pentru toți pacienții pentru a demonstra originea neuroendocrină. Imunomarcarea pentru marker-ul de proliferare celulară Ki-67 a fost realizată doar pentru pacienții care au fost supuși intervenției chirurgicale, pe piesele de rezecție chirurgicală.

Rezultate și discuții

Pe baza analizei masele focale pancreatice maligne diagnosticate în perioada studiului nostru, am inclus un număr de 131 de pacienți consecutivi: 14 pacienți cu tumori neuroendocrine pancreatice și 117 pacienți cu adenocarcinoame pancreatice. Sensibilitatea EUS-VI pre-contrast pentru diagnosticul PNETs a fost 71.43%, similară cu EUS-FNA. După utilizarea substanței de contrast, EUS-VI este crescută la nivelul PNETs (27.07%) comparativ cu adenocarcinoamele pancreatice (9.82%), $p < 0.001$. Sensibilitatea EUS-VI post-contrast a fost de 100%, cu o specificitate de 79.49% și acuratețe de 81.68%.

Pentru diagnosticul PNETs, EUS pare să fie cea mai bună metodă de diagnostic, având o acuratețe de 93%, chiar și atunci când este comparată cu CT (*Ardengh et al., 2004; Khashab et al., 2011*).

Deși este bine cunoscut faptul că PNETs sunt tumori hipervasculare, cuantificarea vascularizației utilizând parametrii power Doppler nu este încă suficient studiată. Studiul nostru demonstrează fezabilitatea utilizării EUS-VI pentru evaluarea și diagnosticul PNETs. Acest parametru este deja studiat în adenocarcinoamele pancreatice, cu o bună sensibilitate, specificitate și acuratețe, putând fi utilizat și împreună cu elastografia. Evaluarea vascularizației utilizând EUS-VI poate fi de asemenea o metodă utilă de diferențiere între PNET și adenocarcinoame pancreatice.

Concluzii

EUS power Doppler reprezintă o metodă utilă pentru evaluarea inițială a PNET. Prin evaluarea vascularizației utilizând EUS-VI, diferențierea între PNET și adenocarcinoamele pancreatice este posibilă, în special pentru sub-grupurile de pacienți la care EUS-FNA este fals negativă.

Acest lucru nu exclude utilizarea EUS-FNA pentru evaluarea imunocitochimică, aceasta având o sensibilitate acceptabilă pentru diagnosticul PNET și o specificitate și acuratețe crescute.

Concluzii finale

Nivelurile proteinei VEGF-A sunt crescute la nivelul celulelor neuroendocrine, în timp ce nicio diferență biologică sau statistică nu a fost observată între nivelurile ARNm VEGF-A între grupul de pacienți și grupul control.

Nu am observat nicio corelație între nivelurile VEGF-A și MVD. Astfel, VEGF-A este în principal implicat în menținerea arhitecturii și funcțiilor endoteliale și utilizarea sa drept marker asociat cu formarea de vase sanguine nu este fezabilă

Gastrina nu promovează transcripția genei VEGF-A, dar o reglare post-transcripțională a expresiei genice este posibilă.

VEGF-A a fost exprimată în toate probele de pancreatită cronică și adenocarcinoame, iar expresia sa la nivelul adenocarcinoamelor pancreatice a fost semnificativ crescută comparativ cu țesutul normal.

EGFR este semnificativ supra-exprimat la nivelul adenocarcinoamelor pancreatice comparativ cu țesutul normal.

Expresia EGFR a fost corelată cu invazivitatea adenocarcinoamelor, în timp ce expresia VEGF-A a fost corelată negativ cu dimensiunea tumorii. EGFR poate fi utilizat drept marker diagnostic asociat cu prognosticul în adenocarcinoamele pancreatice.

EUS power Doppler reprezintă o metodă utilă pentru evaluarea inițială a PNET. Prin evaluarea vascularizației utilizând EUS-VI, diferențierea între PNET și adenocarcinoamele pancreatice este posibilă, în special pentru sub-grupurile de pacienți la care EUS-FNA este fals negativă.

Bibliografie selectivă

Ai KX, Lu LY, Huang XY, Chen W, Zhang HZ. Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2008 Mar 28;14(12):1931-5.

Ali MA, Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jaquotte A, Toniolo P, Frenkel K, Huang X. Reliability of serum iron, ferritin, nitrite, and association with risk of renal cancer in women. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(2):116-21.

Ardengh JC, de Paulo GA, Ferrari AP. EUS-guided FNA in the diagnosis of pancreatic neuroendocrine tumors before surgery. *Gastrointest Endosc* 2004;60:378-84.

Atiq M, Bhutani MS, Bektas M, Lee JE, Gong Y, Tamm EP, Shah CP, Ross WA, Yao J, Raju GS, Wang X, Lee JH. EUS-FNA for Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Tertiary Cancer Center Experience. *Dig Dis Sci.* 2011 Oct 1. [Epub ahead of print]

Bergmann F, Breinig M, Höpfner M, Rieker RJ, Fischer L, Köhler C, Esposito I, Kleeff J, Herpel E, Ehemann V, Friess H, Schirmacher P, Kern MA. Expression pattern and functional relevance of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2: novel chemotherapeutic targets in pancreatic endocrine tumors? *Am J Gastroenterol.* 2009 Jan;104(1):171-81

Blaine SA, Ray KC, Branch KM, Robinson PS, Whitehead RH, Means AL. Epidermal growth factor receptor regulates pancreatic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Sep;297(3):G434-41.

Bloomston M, Bhardwaj A, Ellison EC, Frankel WL. Epidermal growth factor receptor expression in pancreatic carcinoma using tissue microarray technique. *Dig Surg.* 2006;23(1-2):74-9.

Bussolati G, Volante M, Papotti M: Classic and recent special stains used in differential diagnosis of endocrine tumors. *Endocr Pathol* 2001; 12: 379–387.

Chung GG, Yoon HH, Zerkowski MP, Ghosh S, Thomas L, Harigopal M, Charette LA, Salem RR, Camp RL, Rimm DL, Burtness BA. Vascular endothelial growth factor, FLT-1, and FLK-1 analysis in a pancreatic cancer tissue microarray. *Cancer.* 2006 Apr 15;106(8):1677-84.

Couvelard A, O'Toole D, Turley H, Leek R, Sauvanet A, Degott C, Ruszniewski P, Belghiti J, Harris AL, Gatter K, Pezzella F. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer.* 2005 Jan 17;92(1):94-101.

Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A, Gatti S, Cairo G, Fargion S. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *Am J Pathol.* 2008 Mar;172(3):738-47.

Ehehalt F, Saeger HD, Schmidt CM, Grützmann R. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Oncologist.* 2009 May;14(5):456-67.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-6.

Hewitt MJ, McPhail MJ, Possamai L, Dhar A, Vlavianos P, Monahan KJ. EUS-guided FNA for diagnosis of solid pancreatic neoplasms: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2012;75(2): 319-31.

Harned J, Ferrell J, Lall MM, Fleisher LN, Nagar S, Goralska M, McGahan MC. Altered ferritin subunit composition: change in iron metabolism in lens epithelial cells and downstream effects on glutathione levels and VEGF secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Sep;51(9): 4437-46.

Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, Asimakopoulos B, Polychronidis A, Anagnostoulis S, Simopoulos C. Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett.* 2003 May 8;194(1):119-24.

Khashab MA, Yong E, Lennon AM, Shin EJ, Amateau S, Hruban RH, Olin K, Giday S, Fishman EK, Wolfgang CL, Edil BH, Makary M, Canto MI. EUS is still superior to multidetector computerized tomography for detection of pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastrointest Endosc.* 2011 Apr;73(4):691-6.

Klöppel G, Couvelard A, Perren A, Komminoth P, McNicol AM, Nilsson O, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B, Papotti M, Rindi G, Plöckinger U; ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. Mallorca Consensus Conference participants; European Neuroendocrine Tumor Society. *Neuroendocrinology.* 2009;90 (2):162-6.

Kuiper P, Hawinkels LJ, de Jonge-Muller ES, Biemond I, Lamers CB, Verspaget HW. Angiogenic markers endoglin and vascular endothelial growth factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World J Gastroenterol.* 2011 Jan 14;17(2):219-25.

La Rosa S, Uccella S, Finzi G, Albarello L, Sessa F, Capella C. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in digestive endocrine tumors: correlation with microvessel density and clinicopathologic features. *Hum Pathol.* 2003 Jan;34(1):18-27.

Lloyd RV: Practical markers used in the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 2003; 14: 293–301

Luo G, Long J, Qiu L, Liu C, Xu J, Yu X. Role of Epidermal Growth Factor Receptor Expression on Patient Survival in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Pancreatology.* 2012 Jan 17;11(6):595-600

Metz DC, Jensen RT. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology.* 2008;135:1469-1492

Muslimov GF. Role of epidermal growth factor gene in the development of pancreatic cancer and efficiency of inhibitors of this gene in the treatment of pancreatic carcinoma. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Apr;145(4):535-8.

Napoleon B, Alvarez-Sanchez MV, Gincoul R, Pujol B, Lefort C, Lepilliez V, Labadie M, Souquet JC, Queneau PE, Scoazec JY, Chayvialle JA, Ponchon T. Contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasound in solid lesions of the pancreas: results of a pilot study. *Endoscopy.* 2010;42 (7):564-70.

O'Grady HL, Conlon KC. Pancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2008 Mar; 34(3):324-32.

Poncet G, Villaume K, Walter T, Pourreyron C, Theillaumas A, Lépinasse F, Hervieu V, Cordier-Bussat M, Scoazec JY, Roche C. Angiogenesis and tumor progression in neuroendocrine digestive tumors. *J Surg Res.* 2009 Jun 1;154(1):68-77

Săftoiu A, Iordache SA, Gheonea DI, Popescu C, Maloş A, Gorunescu F, Ciurea T, Iordache A, Popescu GL, Manea CT. Combined contrast-enhanced power Doppler and real-time sonoelastography performed during EUS, used in the differential diagnosis of focal pancreatic masses (with videos). *Gastrointest Endosc.* 2010;72(4):739-47.

Takahashi Y, Akishima-Fukasawa Y, Kobayashi N, Sano T, Kosuge T, Nimura Y, Kanai Y, Hiraoka N. Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:187-96

Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lekstan A, Lampe P, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, Malecka-Panas E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) genotype and serum concentration in patients with pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2010 Dec;61(6):711-6.

Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, Bregeaud L, Pepper MS, Ruzniewski P, Belghiti J, Fléjou J, Degott C. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology*. 1998 Feb;32(2):133-8.

Ueda S, Ogata S, Tsuda H, Kawarabayashi N, Kimura M, Sugiura Y, Tamai S, Matsubara O, Hatsuse K, Mochizuki H. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004 Jul;29(1):e1-8.

Vidal S, Oliveira MC, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd R. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in the GH3 cell line. *Cell Tissue Res*. 2000 Apr;300(1):83-8.

Voss M, Hammel P, Molas G, et al. Value of endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of solid pancreatic masses. *Gut* 2000;46:244-9.

Zhang J, Jia Z, Li Q, Wang L, Rashid A, Zhu Z, Evans DB, Vauthey JN, Xie K, Yao JC. Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer* 2007;109:1478-86

Zhang L, Yuan SZ. Expression of c-erbB-2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and TGF-beta1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2002 Nov;1(4):620-3.