

# Fibronectina biliar no diagnóstico de estenoses biliares

## *Bile fibronectin in biliary stricture diagnosis*

Laura Cotta Ornellas, MD, PhD; Frank Shigueo Nakao, MD; Maria Rachel da Silveira Rohr, MD, PhD; Marilisa Moraes Barros Leite-Mor; Edison Parise, MD, PhD; Angelo Paulo Ferrari, MD, PhD

### Resumo

**Introdução:** Ainda, não existe método ideal para o diagnóstico diferencial entre estenoses biliares malignas e benignas. Este estudo visa a comparar a concentração de fibronectina biliar nos pacientes com e sem estenose biliar maligna. **Métodos:** Durante a pancreatocolangiografia retrógrada endoscópica (PCRE), foram coletadas amostras de bile de 50 pacientes com estenose biliar extra-hepática maligna (40), benigna (10) e de 10 doentes sem estenose biliar (grupo controle). A fibronectina total na bile foi determinada por ensaio imunoenzimático. A concentração sérica de bilirrubina direta, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase foi determinada nos pacientes com estenose biliar antes da PCRE. O diagnóstico final foi definido por cirurgia, biópsia ou acompanhamento clínico. **Resultados:** Os pacientes com neoplasia maligna eram significativamente mais idosos ( $p= 0,02$ ) e apresentaram níveis mais elevados dos testes bioquímicos relacionados à colestase ( $p< 0,01$ ). Não houve diferença significativa na concentração de fibronectina biliar entre os pacientes com estenose maligna ( $694,2 \pm 823,5$  ng/ml), benigna ( $828,9 \pm 925$ ng/ml) e grupo controle ( $466,5 \pm 621,5$  ng/ml), ou entre os pacientes com ( $721,2 \pm 836,6$  ng/ml) e sem estenose ( $466,5 \pm 621,5$  ng/ml). **Conclusões:** As médias de idade e de resultados de exames laboratoriais relacionados à colestase foram mais elevadas nos pacientes com neoplasia maligna. A dosagem apenas da fibronectina total na bile não foi eficaz para diagnóstico diferencial das estenoses biliares.

**Palavras-chave:** Bile, Pancreatocolangiografia, Fibronectina, Icterícia.

## Abstract

**Background:** The methods currently available for differential diagnosis between benign and malignant biliary strictures are suboptimal. This study aimed to compare bile fibronectin levels in patients with malignant biliary stricture, benign stricture, and those without obstructive lesions. **Methods:** Bile samples were collected in 50 patients with malignant (40) and benign (10) extra-hepatic biliary stricture and 10 patients without biliary stricture (control group) during endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). Total bile fibronectin was determined by enzymatic immunoassay. Direct bilirubin, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase serum levels were determined in patients with biliary stricture before ERCP. Final diagnosis was established by surgery, biopsy, or follow-up. **Results:** Patients with malignant neoplasia were significantly older ( $p= 0.02$ ) and had higher levels of biochemical tests related to cholestasis ( $p< 0.01$ ). There was no significant difference in bile fibronectin level between patients with malignant stricture ( $694.2 \pm 823.5$  ng/ml), benign stricture ( $828.9 \pm 925$  ng/ml), and controls ( $466.5 \pm 621.5$  ng/ml), or between patients with ( $721.2 \pm 836.6$  ng/ml) and without stricture ( $466.5 \pm 621.5$  ng/ml). **Conclusions:** Mean age and laboratory levels related to cholestasis were higher in patients with malignant neoplasia. Isolated determination of total bile fibronectin was not efficient for the differential diagnosis of biliary strictures.

**Key words:** Bile, Cholangiopancreatography, Fibronectin, Jaundice.

## INTRODUÇÃO

A fibronectina é uma glicoproteína estrutural, composta por duas subunidades quase idênticas, amplamente distribuída na superfície das células, na matriz extracelular, no plasma e outros líquidos corporais.<sup>1,2</sup> Intereage com outros componentes da matriz extracelular além de estar envolvida em várias atividades biológicas como adesão, motilidade e diferenciação das células, hemostasia e cicatrização de feridas.<sup>2</sup>

Vários autores demonstraram que a concentração de fibronectina em fluidos corporais como ascite, urina ou sangue pode ser útil na diferenciação entre neoplasia maligna e lesão benigna, e poderia ser utilizada como um marcador bioquímico de malignidade.<sup>3,10</sup> Alguns autores estudaram a importância da fibronectina na bile para o diagnóstico de malignidade, com resultados animadores.<sup>2,11,12</sup>

Pacientes com obstrução biliar são submetidos freqüentemente à pancreatocolangiografia retrógrada endoscópica (PCRE) para diagnóstico e drenagem. Os métodos disponíveis durante PCRE para diagnóstico tecidual da lesão obstrutiva têm alta especificidade, mas baixa a moderada sensibilidade.<sup>13</sup> A coleta de bile é fácil de ser realizada durante a PCRE. Métodos diagnósticos baseados na análise bioquímica da bile poderiam se transformar em ferramentas simples e eficazes para o diagnóstico de malignidade comprometendo os ductos biliares.

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da concentração de fibronectina na bile para o diagnóstico diferencial dos pacientes com estenose biliar.

## MATERIAL E MÉTODO

### PACIENTES

A bile de pacientes consecutivos, com estenose do ducto biliar extra-hepático, encaminhados ao setor de endoscopia da UNIFESP para diagnóstico e/ou tratamento, foi coletada da região proximal à estenose durante PCRE. Foram excluídos pacientes com tumores periampulares visíveis endoscopicamente, estenoses que não permitiam a passagem de cateter e casos submetidos à introdução de prótese biliar antes do início do estudo. O grupo foi constituído por pacientes com neoplasia maligna ( $n=40$ ) e estenose benigna ( $n=10$ ). Foi, ainda, coletada bile de 10 pacientes sem estenose biliar submetidos à PCRE, para constituir o grupo controle.

O diagnóstico etiológico definitivo da estenose foi baseado em achados cirúrgicos, diagnóstico citopatológico da lesão, infiltração de órgãos adjacentes ou metástases, ou durante o acompanhamento clínico dos pacientes por pelo menos seis meses, com controle por exames de imagem.

### MÉTODO

A PCRE foi realizada com técnicas habituais. Foi coletada bile no início do procedimento, após injeção de pequena quantidade de contraste para posicionar o cateter acima da estenose. No grupo controle, a bile foi aspirada na porção média do ducto biliar comum. A bile foi colocada em tubos de vidro e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise, por período inferior a três meses.

A fibronectina biliar foi determinada por ensaio imunoenzimático de fase sólida (Takara Shuzo Co., Shiga, Japão), baseado em método "sanduíche" com anticorpos anti-fibronectina humana monoclonais de camundongo em procedimento de duas fases. Para testar a precisão da dosagem no líquido biliar, quantidades crescentes de fibronectina padrão foram adicionadas à concentração fixa de líquido biliar e a taxa de recuperação foi de 97,3%. A variação intra-ensaio do método foi de 5,4% e a inter-ensaio menor do que 10%.

Antes da PCRE, nos pacientes com estenose biliar, foi coletado sangue para a dosagem de bilirrubina direta (BD), fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

## ÉTICA

Foi obtido consentimento informado, por escrito, de todos os pacientes antes do procedimento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo/ UNIFESP, seguindo as diretrizes da Declaração de Helsinky de 1975, revisada em 1983.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas foram descritas por meio da média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ). Todas as variáveis foram comparadas entre os grupos através do teste *t* de Student ou por análise de variância. A relação linear de fibronectina biliar com BD, FA, GGT, AST e ALT foi avaliada por meio do coeficiente de correlação linear de Pearson. Em todas as comparações, resultados de *p*

inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

## RESULTADOS

Os diagnósticos finais dos 40 pacientes com neoplasia maligna foram adenocarcinoma de pâncreas (18), colangiocarcinoma (17), neoplasia de vesícula biliar (2), metástases (2) e carcinoma neuroendócrino do pâncreas (1). Lesão benigna foi observada, após um acompanhamento de 17 a 39 meses, em 10 pacientes, pancreatite crônica (6) e estenose inflamatória secundária a cálculos biliares (4). Os diagnósticos no grupo controle foram PCRE normal (6) e cálculos no ducto biliar comum (4).

Os pacientes com neoplasia maligna foram significativamente mais idosos ( $p=0,02$ ), com média de idade de 64 anos (42 a 82 anos), enquanto aqueles com lesão benigna apresentavam média de 54 anos (39 a 68 anos). Os exames laboratoriais dos pacientes no momento da PCRE estão representados na Tabela 1. Foi observado que os pacientes com neoplasia maligna apresentaram níveis mais elevados de FA, GGT, BD, AST e ALT. Não foi observada relação linear entre qualquer parâmetro sérico e a fibronectina biliar.

Não houve diferença estatisticamente significativa dos valores de fibronectina biliar quando os pacientes com neoplasia maligna ( $694,2 \pm 823,5$  ng/ml), lesão benigna ( $828,9 \pm 925$  ng/ml) e do grupo controle ( $466,5 \pm 621,5$  ng/ml) foram comparados (Tabela 2 e Figura 1), ou quando os pacientes com estenose benigna ou maligna ( $721,2 \pm 836,6$  ng/ml) foram comparados ao grupo controle ( $466,5 \pm 621,5$  ng/ml).

**Tabela 1.** Exames laboratoriais dos pacientes com doença maligna (40) e benigna (10)

Exames (valores normais)	Maligna $M \pm DP$	Benigna $M \pm DP$	<i>p</i>
Fibronectina biliar (ng/ml)	$694,2 \pm 823,5$	$828,9 \pm 925,0$	NS
FA (50 - 250 U/l)	$1728,4 \pm 1260,8$	$503,9 \pm 338,5$	< 0,01
GGT (11- 49 U/l)	$857,3 \pm 758,3$	$357,9 \pm 411,5$	0,05
BD (0,1 – 0,4 mg/dl)	$16,9 \pm 11,4$	$1,9 \pm 3,0$	< 0,01
AST (< 38 U/l)	$139,5 \pm 76,2$	$56,4 \pm 36,9$	< 0,01
ALT (< 41 U/l)	$136,2 \pm 96,3$	$58,8 \pm 55,5$	0,02

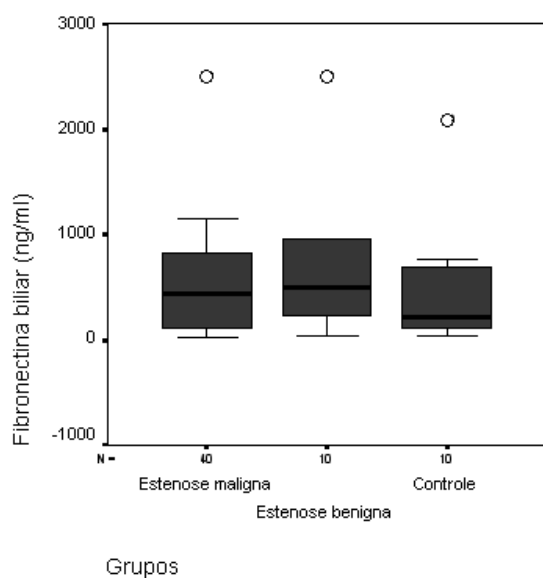
$M \pm DP$ = média  $\pm$  desvio padrão, NS= não significativo, FA= fosfatase alcalina, GGT= gama glutamiltransferase, BD= bilirrubina direta, AST= aspartato aminotransferase, ALT= alanina aminotransferase

**Tabela 2.** Exames laboratoriais dos pacientes com doença maligna (40) e da combinação do grupo com doença benigna com o grupo controle (20)

Exames (valores normais)	Maligna $M \pm DP$	Benigna + Controle $M \pm DP$	<i>p</i>
Fibronectina biliar (ng/ml)	$694,2 \pm 823,5$	$647,7 \pm 789,2$	NS

$M \pm DP$ = média  $\pm$  desvio padrão, NS= não significativo

**Figura 1.** Fibronectina biliar dos pacientes com doença maligna (40), do grupo com doença benigna (10) e do grupo controle (10)



## DISCUSSÃO

Estenoses biliares com aspecto maligno podem ser encontradas durante PCRE, mas a diferenciação precisa entre etiologias benigna e maligna continua sendo um desafio. A coleta de material para análise durante PCRE é a forma mais prática para determinação do diagnóstico quando esta é utilizada para avaliação, estadiamento e/ou terapia paliativa, definitiva ou temporária.<sup>14</sup>

O quadro clínico dos pacientes com estenose biliar geralmente tem valor limitado na definição do diagnóstico final.<sup>15</sup> Entretanto, a idade do paciente deve ser considerada na formulação da hipótese diagnóstica. No presente estudo, a média de idade dos portadores de neoplasia maligna foi dez anos superior à daqueles com lesão benigna.

Quanto aos exames laboratoriais, observamos que os testes que avaliam colestase estavam significativamente mais elevados no grupo com estenose maligna. A maior diferença entre os grupos foi evidenciada na dosagem de BD. De acordo com a análise estatística, não houve correlação entre os valores de BD e os outros testes (FA, GGT, AST e ALT). No estudo de Buffet et al.<sup>16</sup>, envolvendo 100 pacientes com doenças biliopancreáticas de etiologias maligna e benigna, a média dos valores de bilirrubinemia também foi significativamente maior em neoplasia maligna do que em lesão benigna.

Körner et al.<sup>2</sup> utilizaram o método *time-resolved fluorescence immunoassay* para a determinação da fibronectina biliar e compararam a concentração de

fibronectina biliar entre dois grupos, o de pacientes com neoplasia maligna dos ductos biliares e o de pacientes com colangiografia normal ou com cálculos biliares. As altas sensibilidade (89%) e especificidade (96%) da concentração de fibronectina total encontradas para o diagnóstico de carcinoma dos ductos biliares fortaleceram a hipótese de que a origem da fibronectina fosse a região tumoral.

No presente estudo, inicialmente comparamos a concentração de fibronectina biliar, determinada por imunoenensaio enzimático, entre um grupo com estenose biliar maligna e outro que apresentava estenose benigna. Como não observamos diferença na concentração de fibronectina biliar entre os grupos estudados, cogitamos a possibilidade de a estenose, independentemente de sua etiologia, influenciar os níveis de fibronectina. Assim, optamos por adicionar, ao estudo, pacientes sem estenose biliar, ou seja, que apresentavam PCRE normal ou com cálculos biliares. Da mesma forma, não observamos diferença na concentração de fibronectina biliar entre os pacientes com estenose (benigna ou maligna) e aqueles do grupo controle.

Achados semelhantes foram observados por Chen et al.<sup>12</sup>, que também não conseguiram diferenciar estenoses biliares benignas e malignas ou mesmo portadores de colelitíase, pela dosagem de fibronectina total. Os autores compararam a concentração de fibronectina biliar, também dosada por meio de imunoenensaio enzimático, em três grupos, o de pacientes com cálculos biliares, o de pacientes com estenose biliar benigna e o de pacientes que apresentavam colangiocarcinoma. No entanto, Chen et al.<sup>12</sup> encontraram concentrações estatisticamente diferentes nos três grupos com níveis mais elevados nos pacientes com carcinoma, quando utilizaram a concentração relativa da fibronectina biliar, que foi calculada dividindo a concentração absoluta de fibronectina pela concentração dos ácidos biliares na bile coletada. Os autores sugeriram que a correlação fibronectina/sal biliar seria um método diagnóstico melhor para as estenoses malignas, com sensibilidade e especificidade maiores.

Embora a fibronectina seja um reagente inflamatório de fase aguda, a capacidade de concentração biliar pode ser também prejudicada por processos flogísticos, frequentemente associados à presença de cálculos biliares. Portanto, a avaliação da concentração relativa de fibronectina contribuiria, provavelmente, para melhor eficácia diagnóstica.<sup>12</sup> Chen et al.<sup>12</sup> encontraram níveis intermediários da concentração relativa de fibronectina no grupo com cálculos biliares em relação aos pacientes com estenose benigna e colangiocarcinoma ( $p < 0,05$ ).

Concluindo, as médias de idade e de resultados de

exames laboratoriais relacionados à colestase foram mais elevadas no grupo com neoplasia maligna. Nossos resultados confirmam que a dosagem isolada da fibronectina total na bile não é eficaz para diagnóstico diferencial das estenoses biliares.

## REFERÊNCIAS

1. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:375-413.
2. Korner T, Kropf J, Hackler R, Brenzel A, Gressner AM. Fibronectin in human bile fluid for diagnosis of malignant biliary diseases. *Hepatology.* 1996;23(3):423-8.
3. Colli A, Buccino G, Cocciolo M, Parravicini R, Mariani F, Scaltrini G. Diagnostic accuracy of fibronectin in the differential diagnosis of ascites. *Cancer.* 1986;58(11):2489-93.
4. Ylatupa S, Haglund C, Mertaniemi P, Vahtera E, Partanen P. Cellular fibronectin in serum and plasma: a potential new tumour marker? *Br J Cancer.* 1995;71(3):578-82.
5. Haglund C, Ylatupa S, Mertaniemi P, Partanen P. Cellular fibronectin concentration in the plasma of patients with malignant and benign diseases: a comparison with CA 19-9 and CEA. *Br J Cancer.* 1997;76(6):777-83.
6. Choate JJ, Mosher DF. Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer, and acute leukemia. *Cancer.* 1983;51(6):1142-7.
7. Paizi M, Manaster J, Quitt M, Spira G. High plasma fibronectin levels in multiple myeloma patients: possible mechanisms and clinical implications. *Scand J Immunol.* 1991;34(3):285-9.
8. Scholmerich J, Volk BA, Kottgen E, Ehlers S, Gerok W. Fibronectin concentration in ascites differentiates between malignant and nonmalignant ascites. *Gastroenterology.* 1984;87(5):1160-4.
9. Colloredo Mels G, Bellati G, Auriemma L, Perani C, Leandro G, Vacca N, et al. Fibronectin, cholesterol and triglycerides ascitic fluid concentration in the prediction of malignancy. *Ital J Gastroenterol.* 1991;23(4):179-86.
10. Malmstrom PU, Larsson A, Johansson S. Urinary fibronectin in diagnosis and follow-up of patients with urinary bladder cancer. *Br J Urol.* 1993;72(3):307-10.
11. Korner T, Kropf J, Jaspersen D, Hammar CH, Gressner AM. On the diagnostic potential of fibronectin in human bile fluid. *Clin Investig.* 1994;72(4):316.
12. Chen CY, Lin XZ, Tsao HC, Shiesh SC. The value of biliary fibronectin for diagnosis of cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2003;50(52):924-7.
13. De Bellis M, Sherman S, Fogel EL, Cramer H, Chappo J, McHenry L Jr, et al. Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (Part 1). *Gastrointest Endosc.* 2002;56(4):552-61.
14. Farrell RJ, Jain AK, Brandwein SL, Wang H, Chuttani R, Pleskow DK. The combination of stricture dilation, endoscopic needle aspiration, and biliary brushings significantly improves diagnostic yield from malignant bile duct strictures. *Gastrointest Endosc.* 2001;54(5):587-94.
15. Davidson BR. Progress in determining the nature of bile duct strictures. *Gut.* 1993;34:725-6.
16. Buffet C, Fourre C, Altman C, Prat F, Fritsch J, Choury A, et al. Bile levels of carcino-embryonic antigen in patients with hepatopancreatobiliary disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996;8(2):131-4.