

**JOÃO CARLOS DAS NEVES PEREIRA**

**Estudo da correlação entre a  
incidência de metástases em tumores  
carcinóides típicos broncopulmonares  
e biomarcadores teciduais, variáveis  
clínicas e índice de risco**

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

Área de Concentração: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Dr. José Ribas Milanez de Campos

Co-orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

**SÃO PAULO  
2004**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, João Carlos das Neves

**Estudo da correlação entre a incidência de metástases em tumores carcinóides típicos broncopulmonares e biomarcadores teciduais, variáveis clínicas e índice de risco** / João Carlos das Neves Pereira. -- São Paulo, 2004.

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

Área de concentração: Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: José Ribas Milanez de Campos.

Co-orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.TUMOR CARCINÓIDE/classificação 2.TUMORES  
NEUROENDÓCRINOS/classificação 3.CARCINOMA NEUROENDÓCRINO/  
classificação 4.NEOPLASIAS BRÔNQUICAS/classificação 5.METÁSTASE  
NEOPLÁSICA 6.MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR/classificação  
7.MATRIZ EXTRACELULAR/classificação 8.NEOVASCULARIZAÇÃO  
PATOLÓGICA 9.FATORES DE RISCO

USP/FM/SBD-293/04

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Tereza e José Augusto; meus irmãos, Luís e Aida e à minha esposa Elaine.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sentido de todas as coisas.

Aos meus pais, pela vida física, moral e intelectual.

À Dra. Elaine Stabenow, minha esposa, quem sugeriu e desenvolveu o índice de risco para a ocorrência de metástase em tumor carcinóide típico broncopulmonar, além da ajuda em todas as etapas da confecção desta tese.

Aos pacientes que por meio da imensa colaboração e demonstração de amor ao próximo, transformaram seu sofrimento em esperança de melhor diagnóstico, e talvez tratamento, para aqueles que virão a sofrer da doença.

A todo o povo brasileiro que por sua generosidade, permitiu a mim e a minha família viver em liberdade e em paz, e que por todo tipo de privação proporcionou-me instrução acadêmica gratuita, do primário à pós-graduação.

Ao amigo Leandro Luongo de Matos, acadêmico da Faculdade de Medicina do ABC, quem ajudou em todas as etapas deste trabalho e de todos os outros desta linha de pesquisa, além de ter iniciado outros trabalhos de sua autoria e implantado o laboratório de imunohistoquímica para estudo de neoplasias neuroendócrinas em sua faculdade. Teve papel decisivo para a conclusão dessa tese no prazo planejado.

À família Luongo de Matos, que incentivou extraordinariamente o desenvolvimento deste trabalho e de outros no grupo de pesquisas. Auxiliou de forma decisiva para a diagramação, impressão, encadernação da tese. Gentilmente disponibilizou programas de informática indispensáveis para o desenvolvimento dos trabalhos e ajudou a instalação do laboratório de estudos de tumores neuroendócrinos na Faculdade de Medicina do ABC.

Ao colega e amigo, Dr. Marcos Naoyuki Samano, quem me convenceu a fazer residência em cirurgia torácica, a quem devo a felicidade de ter enveredado neste caminho. Levou-me às primeiras operações da especialidade e acompanhou-me para que comprasse meu primeiro *Pearson*.

Ao Dr. José Ribas Milanez de Campos, que desde o primeiro dia de minha residência em cirurgia torácica incentivou-me no aprimoramento profissional, acadêmico e didático, incentivou e financiou a realização de estágios e cursos inclusive no exterior, além de aceitar orientar-me quando não havia qualquer garantia de que conseguiríamos completar a tarefa.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Luiza Capelozzi, minha co-orientadora e verdadeira mãe acadêmica, ensinou-me desde como confeccionar e corar as lâminas nos primeiros dias desta empreitada, até como enviar trabalhos para revistas estrangeiras nos últimos, sem a qual não teria concluído, desenvolvido, ou mesmo começado este trabalho. Disponibilizou todo o aparato logístico do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene, quem desde meados da residência incentivou-me a permanecer no Serviço, concedeu-me a felicidade de poder ministrar aulas práticas aos alunos da graduação, ofereceu-me toda a infraestrutura do Ambulatório de Carcinomas Neuroendócrinos Broncopulmonares, financiou o desenvolvimento dos meus trabalhos e ajudou-me a apresentá-los em Congressos no Brasil e no exterior.

Ao Dr. Alexandre Muxfeldt Ab'Saber, o Xandão, pesquisador no campo de neoplasias pulmonares, quem me ensinou a diferenciar os carcinomas neuroendócrinos, contar os marcadores e contribuiu com inúmeras idéias, além de enviar o trabalho à apreciação do Dr. Willian Travis.

Ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas, patologista de grande experiência em doença pulmonar, sempre disposto a ajudar e me orientar ante as dúvidas surgidas no decorrer da pesquisa.

Ao colega e amigo Dr. Aurelino Fernandes Schmidt Júnior, quem iniciou a busca e estudo dos prontuários, organizou os dados clínicos em planilhas e o registro dos blocos de parafina para sua recuperação. Fez os primeiros contatos com os pacientes e sugeriu a abertura de um ambulatório para acompanhá-los.

Ao Prof. Dr. Olavo Ribeiro Rodrigues, verdadeiro mestre nos sentidos acadêmico e humano, quem orientou o Dr. Aurelino Fernandes Schmidt Júnior no início deste trabalho e sempre esteve à disposição para discussões, além de ter iniciado projeto para o estudo conjunto de apoptose em carcinomas neuroendócrinos pulmonares entre nossa faculdade e a Faculdade de Medicina de Mogi das Cruzes, por intermédio do Dr. Milton Luis Yaekashi.

Ao Prof. Dr. João Aléssio Juliano Perfeito, que durante os últimos dois anos, mensalmente na reunião da Sociedade Paulista de Cirurgia Torácica e em todas as oportunidades em eventos científicos, fez sugestões indispensáveis ao sucesso desta tese, orientou-me a estudar todos os linfonodos ressecados e, inclusive, a pesquisar micrometástase, trabalho este que já está em andamento.

Ao Prof. Dr. Vicente Forte que me orientou a estudar a tese do Dr. Pedro Luis Reis Crotti, além de sugerir que realizasse o levantamento de dados clínicos e dos exames endoscópicos dos pacientes, a fim de traçar o seu perfil pré-operatório detalhado. Disponibilizou também os registros dos pacientes da tese do Dr. Pedro Luis Reis Crotti e a consulta aos prontuários no Hospital São Paulo.

Às amigas Ana Lucia Garippo, Ângela Batista dos Santos, Esmeralda Miristene Eher e Sandra de Moraes Fernezhian, profissionais exemplares, pelo profundo conhecimento e enorme dedicação, que fazem do laboratório de imunohistoquímica um dos orgulhos da nossa Faculdade e nosso país, pois todas as vezes, sem exceção, que apresentei os trabalhos no exterior, houve menção à altíssima qualidade das colorações por elas realizadas.

À Dra. Estela Novak, pesquisadora de projeção internacional que se integrou ao grupo, introduziu em nosso meio a experiência na manipulação e bloqueio de RNAm e fatores de transcrição envolvidos ao fenômeno de angiogênese em neoplasias. Gentilmente doou os anticorpos contra os VEGFs, que estão sendo utilizados nos trabalhos da Dra. Mariana Laloni Tosello.

Ao Dr. Ricardo Beyruti, nosso professor de cirurgia torácica oncológica, a quem devo meus conhecimentos cirúrgicos em oncologia pulmonar e todas as minhas chatices operatórias. Graças à sua exigência na observação dos rigores técnico-científicos durante a assistência, pesquisa e ensino, contribui imensamente para a manutenção da qualidade destas atividades.

À Dra. Tereza Tae Takagaki, nossa professora de oncologia clínica torácica, modelo de dedicação aos doentes, residentes e alunos, a quem devo os conhecimentos adquiridos em oncologia clínica pulmonar.

Ao Dr. Ângelo Fernandez que realizou levantamento entre seus pacientes dos Hospitais Alemão Oswaldo Cruz e Sírio Libanês, além de apresentar-me à Dra. Kátia Leite, quem gentilmente, sempre que preciso, auxiliou e

incentivou o grupo de estudos de carcinomas neuroendócrinos, neste trabalho e em outros projetos desta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Roberto Saad Júnior, que além de disponibilizar a casuística da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, sugeriu o estudo da correlação entre os padrões histológicos dos tumores carcinóides típicos e seu prognóstico, trabalho que vem sendo desenvolvido por acadêmicos como projeto de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, responsável pelo Programa de Pós-graduação do Instituto do Coração, quem orientou de forma crucial a escolha das medidas a serem tomadas para que não se perdesse, por ignorância em estatística e epidemiologia, dados essenciais às conclusões deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Anói Castro Cordeiro, pelo apoio, pelas sugestões sobre o índice de risco e estilo literário.

Ao Prof. Dr. Riad Nain Younes, pela brilhante e pioneira iniciativa de promover a divulgação, estimular o estudo, a pesquisa e o intercâmbio entre profissionais que tratam de pacientes que sofrem da doença, fundador do Clube do Tumor Neuroendócrino.

Ao amigo Douglas Moreira, responsável pelo blocário do Serviço de Patologia do nosso hospital, verdadeiro guardião dos espécimes arquivados ao zelar para que sejam bem cuidados, preservados e organizados, sempre disposto a orientar com profissionalismo e paciência todos aqueles que necessitam manusear os blocos de parafina.

Aos colegas Alecsander Guilharman Pereira da Silva e Fabiana Soares, que auxiliaram na preparação e leitura das lâminas e na organização dos dados obtidos. Confeccionaram as planilhas para análise destes e prepararam o trabalho para sua primeira apresentação em Congresso.

Aos amigos Gisele da Silva Campos e Francisco Denis Batista Veiga, funcionários do arquivo do Serviço de Patologia do Instituto do Coração, que auxiliaram na recuperação de blocos, lâminas e laudos. Estiveram à inteira disposição a todo o momento necessário.

Ao Dr. Mauro Canzian, patologista do Instituto do Coração, que não somente auxiliou no levantamento dos casos, como também confeccionou lâminas em HE para a escolha de blocos.

À Eva Malheiros de Oliveira, Juliana Lattari Sobrinho e Neusa Rodrigues Dini, da secretaria de pós-graduação, que desde a minha matrícula no programa ajudaram de todas as formas, ao orientar e sugerir disciplinas que julgaram indispensáveis, dado a impossibilidade de freqüentar todas as que nos interessam. Zelaram para que eu não esquecesse de escrever os relatórios referentes à bolsa CAPES e incentivaram a vinda de colegas para trabalhar nesta linha de pesquisa. E estes, realmente vieram.

Aos amigos Aristides Tadeu Correia (Ari), Eliana Ogata e Rosângela Monteiro, do Laboratório Anátomo Cirúrgico do Instituto do Coração, que desde os primeiros dias deste trabalho, ajudaram-me a redigir e imprimir resultados parciais da pesquisa, como também a confeccionar os cartazes para exposição em congressos. Ajudaram de todas as formas a programar, e tornar possíveis, as viagens relativas às apresentações dos trabalhos.

À severa e competentíssima Ivete Regina Vieira Torres, mentora e administradora do Ambulatório de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sem a qual não teríamos um ambulatório nos moldes que temos, modelo não somente para o HC, mas para qualquer serviço ambulatorial, verdadeiro Nexus 6, Replicon.

Ao Dr. Hélio Minamoto, quem orientou o formato adequado para escrever a tese, além de sugerir o estudo dos tecidos metastáticos, o que está sendo desenvolvido como tese de doutoramento por este Programa de Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, quem sugeriu a quantificação de vasos linfáticos e o estudo de expressão do VEGF-C, tema da tese da doutoranda Mariana Laloni Toselo, além de calcular o volume das lesões tumorais neste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Martins Xavier, meu veterano na residência, na pós-graduação e na vida, quem me guiou na escolha das disciplinas básicas de estatística e epidemiologia.

Aos amigos Ana Paula Coimbra Israel, Antônio Grimaloff Júnior (Tonhão) e Gillian César Lopez, equipe de médicos do Instituto Brasileiro de Controle do

Câncer, que encaminham protocolarmente todos os pacientes com carcinomas neuroendócrinos torácicos para o nosso Serviço, além de relatarem os casos de tumores carcinóides do IBCC sempre em conjunto com nosso ambulatório.

Aos colegas Dr. Eduardo de Campos Werebe e Dr. Laerte de Oliveira Andrade Filho, que apoiaram, patrocinaram e ajudaram de forma direta nos trabalhos ao encaminharem ao nosso ambulatório seus pacientes operados de tumor carcinóide nos Hospitais São Luiz, Paulistano, Israelita Albert Einstein e Iguatemi, além de relatarem casos para congressos em conjunto com nosso Serviço.

À Dra. Carla Ismael e Prof. Dr. Christian Domege, pelo estabelecimento de intercâmbio entre pesquisadores e médicos brasileiros e europeus, proporcionando a mim e a integrantes do grupo de pesquisa de carcinoma neuroendócrino pulmonar a oportunidade de trocar informações e de comparecermos a estágios no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital Oncológico Antoine Lacassagne, em Nice.

**“Que eu seja humilde em tudo, exceto na busca de conhecimento...”**

**...ó Senhor que me designaste para cuidar da saúde de tuas criaturas, eis-me aqui, pronto para minha vocação”**

*(Oração do Médico - Rabi Maimon, sábio, filósofo e médico judeu)*

Esta tese está de acordo com:

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 Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

# SUMÁRIO

Lista de Siglas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 O espectro de proliferações de células neuroendócrinas broncopulmonares .....	7
2.2 Histórico .....	8
2.3 Classificações da organização mundial de saúde .....	9
2.4 Tratamento dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares .....	10
2.5 Critérios histológicos de agressividade .....	13
2.6 Técnicas imunohistoquímicas e de análise da matriz extracelular auxiliam na determinação do potencial invasivo e metastático .....	14
2.6.1 Quantificação da expressão de marcadores de fenômenos intracelulares .....	14
2.6.1.1 Quantificação da expressão imunohistoquímica da proteína nuclear Ki-67 .....	14
2.6.1.2 Quantificação da expressão imunohistoquímica da proteína nuclear p53 .....	16
2.6.1.3 Quantificação da expressão imunohistoquímica da proteína citoplasmática Bcl-2 .....	17
2.6.2 Quantificação da expressão de marcadores de fenômenos extracelulares .....	19
2.6.2.1 Angiogênese .....	20
2.6.2.2 Fibras colágenas .....	22
2.6.2.3 Fibras elásticas .....	23
2.6.2.4 Densidade estromal .....	24
2.7 Índices de risco .....	25
3. OBJETIVOS DO ESTUDO .....	29
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	31
4.1 Casuística .....	32
4.2 Métodos .....	34
4.2.1 Confirmação do diagnóstico histológico .....	34
4.2.2 Técnicas de coloração .....	36
4.2.2.1 Técnica imunohistoquímica empregada na detecção dos antígenos CD-34, Bcl-2, Ki-67 e p53 .....	36
4.2.2.2 Técnica empregada na coloração das fibras elásticas e colágenas .....	39
4.2.3 Quantificação da marcação encontrada .....	40
4.2.3.1 Determinação dos índices imunohistoquímicos .....	40
4.2.3.2 Quantificação das fibras elásticas e colágenas .....	44
4.2.4 Organização dos dados .....	46
4.2.5 Análise estatística .....	46
4.2.6 Índice de risco para a ocorrência de metástase .....	48

4.2.6.1 Índice de risco com base na análise multivariada.....	48
4.2.6.2 Proposta de um modelo simplificado para índice de risco.....	49
5. RESULTADOS .....	51
5.1 Descrição da casuística.....	52
5.1.1 Gênero.....	52
5.1.2 Idade.....	52
5.1.3 Tipo de ressecção empregada .....	53
5.1.3.1 Via de acesso.....	53
5.1.3.2 Estrutura (s) ressecada (s).....	53
5.1.3.2.1 Dissecção linfonodal .....	54
5.1.4 Lobo ou segmento brônquico acometido.....	55
5.1.5 Localização do tumor em relação à carina .....	55
5.1.6 Dimensões do tumor.....	56
5.1.6.1 Maior diâmetro .....	56
5.1.6.2 Volume.....	56
5.1.7 Comprometimento da margem cirúrgica.....	56
5.1.8 Estadiamento.....	57
5.1.8.1 Características do tumor primário (T) .....	57
5.1.8.2 Metástase linfonodal (N) .....	58
5.1.8.3 Metástase à distância (M).....	59
5.1.8.4 Presença ou ausência de metástase linfonodal e/ou hematogênica.....	61
5.1.9 Seguimento.....	61
5.1.9.1 Tempo de sobrevivência global .....	62
5.1.9.2 Tempo de sobrevivência livre de doença.....	63
5.2 Resultados da análise dos dados da casuística x metástase .....	64
5.2.1 Gênero x metástase .....	64
5.2.2 Idade x metástase .....	64
5.2.3 Central e periférico x metástase .....	64
5.2.4 Dimensões do tumor x metástase .....	64
5.2.4.1 Maior diâmetro tumoral x metástase.....	65
5.2.4.2 Volume tumoral x metástase.....	65
5.2.5 Margem cirúrgica comprometida por tumor x metástase à distância ..	66
5.2.6 TNM x metástase à distância.....	66
5.3 Resultados relativos aos índices de expressão dos marcadores tumorais ..	67
5.3.1 Resultados descritivos dos marcadores .....	67
5.3.1.1 Ki-67.....	67
5.3.1.2 p53 .....	67
5.3.1.3 Bcl-2.....	68
5.3.1.4 CD-34.....	68
5.3.1.5 Fibras colágenas.....	68
5.3.1.6 Fibras elásticas .....	68
5.3.1.7 Densidade estromal .....	69
5.3.2 Marcadores x marcadores .....	69
5.3.3 Marcadores x dimensões tumorais.....	69
5.3.4 Marcadores x metástase.....	70
5.3.4.1 Metástase linfonodal .....	70
5.3.4.2 Metástase à distância .....	71
5.3.4.3 Metástase linfonodal ou à distância .....	71

5.3.4.4 Média dos valores de expressão de cada marcador x grupos de metástase.....	72
5.3.5 Marcadores x sobrevivência .....	78
5.4 Índice de risco para a ocorrência de metástase .....	78
5.4.1 Índice de risco com base na análise multivariada por regressão logística.....	78
5.4.2 Proposta de um modelo simplificado a ser desenvolvido .....	80
5.4.2.1 Transformação das variáveis contínuas em categorizadas .....	80
5.4.2.2 Determinação da razão de chances de cada variável para a ocorrência de metástase.....	80
5.4.2.3 Somatória de pontos para determinação do índice de risco de ocorrência de metástase .....	81
5.4.2.4 Determinação do índice de risco de ocorrência de metástase.....	82
5.4.3 Resultados do modelo de índice de risco proposto .....	82
5.4.3.1 Descritivos.....	82
5.4.3.2 Índice de risco de ocorrência de metástase x metástase .....	82
6. DISCUSSÃO .....	84
6.1 Limitações do trabalho.....	85
6.1.1 Exclusões .....	85
6.1.2 Desenho epidemiológico do estudo.....	87
6.1.3 Perda de seguimento antes de 5 anos .....	88
6.1.4 Óbitos não relacionados .....	88
6.1.5 Sinais e sintomas pré-operatórios .....	89
6.1.6 Exames de imagem .....	90
6.1.7 Dissecção linfonodal hilar e mediastinal .....	91
6.1.8 Análise dos linfonodos .....	94
6.1.9 Limitações de estudos baseados na análise de proteínas .....	95
6.2 O espectro das proliferações neuroendócrinas broncopulmonares .....	97
6.3 Discussão dos resultados dos dados da casuística x metástase.....	100
6.3.1 Gênero x metástase .....	100
6.3.2 Idade x metástase .....	101
6.3.3 Central e periférico x metástase .....	102
6.3.4 Dimensões do tumor x metástase .....	104
6.3.5 Margem cirúrgica comprometida por tumor x metástase.....	106
6.3.6 TNM x metástase à distância.....	107
6.4 Discussão sobre a sobrevivência .....	109
6.4.1 Sobrevivência global.....	109
6.4.2 Sobrevivência livre de doença .....	110
6.5 Discussão dos resultados relativos aos índices de expressão dos marcadores tumorais .....	111
6.5.1 Resultados descritivos dos marcadores .....	111
6.5.2 Marcadores x marcadores .....	114
6.5.3 Marcadores x dimensões tumorais.....	115
6.5.4 Marcadores x metástase.....	116
6.5.4.1 Bcl-2.....	117
6.5.4.2 Ki-67.....	117
6.5.4.3 p53 .....	119
6.5.4.4 CD-34 .....	119

6.5.4.5 Fibras colágenas e elásticas .....	121
6.5.5 Marcadores x sobrevivência .....	122
6.6 Discussão sobre o índice de risco para a ocorrência de metástase .....	122
6.6.1 Índice de risco com base na análise multivariada .....	124
6.6.2 Índice de risco: proposta de um modelo simplificado .....	126
6.7 Perspectivas .....	129
7. CONCLUSÕES .....	131
8. ANEXOS.....	133
8.1 ANEXO A.....	134
8.2 ANEXO B.....	135
8.3 ANEXO C.....	136
8.4 ANEXO D.....	137
8.5 ANEXO E.....	138
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	139
APÊNDICES.....	161

## LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
µm <sup>2</sup>	Micrômetro quadrado
µL	Microlitro
ML	Mililitro
Mg	Miligrama
AgNOR	Regiões organizadoras de nucléolos
AJCC	“American Joint Cancer Committee”
Bcl-2	Antígeno marcador de células de linfoma B
BSA	Soro Albumina Bovina
Cap.	Capítulo
CA	Tumor Carcinóide Atípico
CD-34	Catepsina D-34
CE	Coefficiente de erro
CGA	Campos de Grande Aumento
CPNPC	Carcinoma pulmonar não pequenas células
CT	Tumor Carcinóide Típico
DAB	3-3'-diaminobenzamida
dmv	Densidade de microvasos
DP	Desvio-padrão
ed.	Edição
et al.	e colaboradores
HE	Hematoxilina-eosina

IR	Índice de Risco
LSAB	“Labeled Streptavidin-Avidin-Biotin”
Ki-67	Proteína nuclear Ki-67
M	Metástase
MIBI	2-metoxi-isobutil-isonitrila
N	Linfonodos Regionais
NM	Linfonodos Regionais e Metástase à distância
n	Frequência
NORs	Regiões organizadoras de nucléolo
<i>odds ratio</i>	Razão de chances
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína nuclear p53
p	Probabilidade de erro alfa
p.	Página
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
SPSS	“Statistical Package for Social Science”
status	Condição de óbito ou vivo
T	Tumor primário
T[H3]	Timidina tritiada por hidrogênio marcado
TNM	Sistema internacional de classificação dos tumores malignos
UICC	“Union Internationale Contre le Cancer”
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos .....	35
Tabela 2 – Frequência e porcentagem de lobos ou segmentos brônquicos acometidos por tumor carcinóide típico .....	55
Tabela 3 – Ocorrência de metástase à distância por grupos de estadiamento TNM da UICC .....	66
Tabela 4 – Comparação das médias do índice de expressão de cada marcador entre os grupos de indivíduos com e sem metástase linfonodal .....	70
Tabela 5 – Comparação das médias do índice de expressão de cada marcador entre os grupos de indivíduos com e sem metástase à distância .....	71
Tabela 6 – Comparação das médias do índice de expressão de cada marcador entre os grupos de indivíduos com e sem metástase linfonodal ou à distância.....	71
Tabela 7 – Razão de chances da ocorrência de metástase para cada variável categorizada (base para a ponderação dos pontos) .....	80
Tabela 8 – Pontos a serem somados segundo cada variável categorizada para a determinação do índice de risco (ponderados pela razão de chances para ocorrência de metástase).....	81
Tabela 9 – Índice de Risco (IR) para ocorrência de metástase .....	82
Tabela 10 – Ocorrência de metástase em cada grupo de risco.....	83
Tabela A1– Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes incluídos no estudo .....	134
Tabela B1 – Quantificação dos marcadores estudados.....	135
Tabela C1 – Médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos da expressão de cada marcador e número de casos que não apresentaram marcação.....	136
Tabela D1 – Correlação entre os índices de expressão dos marcadores entre si.....	137
Tabela AP 1 – Análise da sobrevivência global (Kaplan-Meier) .....	apêndice C
Tabela AP 2 – Análise do tempo de sobrevivência livre de doença (Kaplan-Meier).....	apêndice D

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para CD-34 em aumento de 200x. (Caso nº 9).....	40
Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Bcl-2 em aumento de 400x. (Caso nº 9).....	41
Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Ki-67 em aumento de 400x. (Caso nº 9).....	41
Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para p53 em aumento de 200x. (Caso nº 9).....	42
Figura 5 – Fotomicrografia de lâmina de tumor carcinóide típico corado por HE em aumento de 200x, demonstrando a aplicação do retículo na quantificação da expressão da imunohistoquímica encontrada. ....	43
Figura 6 – Fotomicrografia de lâmina corada para fibras colágenas em aumento de 200x. (Caso nº 9).....	44
Figura 7 – Fotomicrografia de lâmina corada para fibras elásticas em aumento de 100x. (Caso nº 9).....	45
Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência em 60 meses.....	62
Figura 9 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença em 60 meses. ....	63
Figura 10 – Gráficos da correlação entre maior diâmetro e volume dos tumores....	65
Figura 11 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de p53 entre grupos (segundo a ocorrência de metástase). ....	73
Figura 12 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de Ki-67 entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).....	74
Figura 13 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de CD-34 entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).....	75
Figura 14 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de fibras colágenas entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).....	76
Figura 15 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de fibras elásticas entre grupos (segundo a ocorrência de metástase). ....	77
Figura 16 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão da densidade estromal entre grupos (segundo a ocorrência de metástase). ....	78
Figura 17 – Curva que representa a equação do risco da ocorrência de metástase determinado para cada valor de dmV medido. ....	79
Figura 18 – Porcentagem de doentes que tiveram metástase em cada grupo de risco. ....	83
Figura E 1 – Distribuição das idades de cada indivíduo por gênero. ....	138
Quadro AP 1 – Classificação Histológica dos Tumores Pulmonares e Pleurais da Organização Mundial da Saúde de 1999.....	apêndice A

## RESUMO

Pereira JCN. *Estudo da correlação entre a incidência de metástases em tumores carcinóides típicos broncopulmonares e biomarcadores teciduais, variáveis clínicas e índice de risco* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Carcinóides típicos são proliferações de células neuroendócrinas. Discute-se se são carcinomas ou adenomas, devido ao seu comportamento ambíguo. É imperativo conhecer seu potencial maligno para que se estabeleça o tratamento adequado. Os relatos de metástase exigem uma definição de quais são os critérios que podem ser utilizados para prever o fenômeno. Atualmente é utilizada a classificação proposta por Travis que estratifica os carcinóides em típicos e atípicos. Porém, todos os pacientes acometidos por carcinóide típico, pela classificação, são considerados como sendo de baixo risco para a ocorrência de metástase, o que torna a proposta insuficiente para se definir conduta terapêutica. O gênero, a idade, a localização central ou periférica, o diâmetro tumoral, e o estadiamento TNM, também já foram descritos como tendo correlação com malignidade em carcinóides. Busca-se descobrir outros critérios que possam ser utilizados para auxiliar na determinação do prognóstico, como os biomarcadores celulares e estromais. O estudo do comportamento celular através de marcadores correlacionados com o fenótipo maligno pode ser realizado utilizando-se a técnica de imunohistoquímica, assim como pelo estudo da matriz extracelular. A análise, para cada paciente, da interação destes fenômenos, permite melhor definição do verdadeiro risco de ocorrência de metástase. A exemplo de outras doenças, permite mesmo a confecção de índices de risco, ponderando-se a contribuição de cada um dos marcadores para a estratificação prognóstica. Com o objetivo de estudar a correlação entre variáveis clínicas (gênero, idade, dimensões e localização do tumor - central ou periférico -, margem de ressecção comprometida e estadiamento TNM) e biomarcadores teciduais, e o potencial metastático dos carcinóides típicos, procedeu-se à quantificação do nível de expressão imunohistoquímica das proteínas p53, Ki-67 e Bcl-2, mensurou-se as fibras colágenas e elásticas e a densidade de microvasos no estroma tumoral, e coletaram-se dados dos prontuários. Metástases linfonodais ocorreram em 9 dos 55 pacientes, e à distância em 6 (2 para o fígado, 1 para osso, 1 para pulmão, 1 para tireóide e 1 para gordura mediastinal). Dois doentes tiveram metástase linfonodal e hematogênica concomitantes. À análise estatística univariada, os 5 biomarcadores (p53, Ki-67 e densidade de microvasos elevados, Bcl-2 e densidade de fibras estromais reduzidos) e o gênero masculino foram relacionados à maior ocorrência de metástase. A faixa etária elevada apresentou tendência a relacionar-se com o fenômeno. À análise multivariada por regressão logística, a densidade de microvasos foi o único fator independentemente relacionado ao fenômeno. O aumento da população estudada poderia, talvez, implicar os outros marcadores como variáveis associadas ao fenômeno, mesmo à análise multivariada por

regressão logística. Estabelecendo-se as correlações, à análise univariada, entre cada marcador, faixa etária e gênero com o fenômeno metastático, foi composto um painel utilizando-se a razão de riscos. Ponderou-se o *odds ratio* e propôs-se um modelo de índice com valores numéricos diretamente proporcionais ao risco de ocorrência de metástase, que apesar de não ter validade externa ao estudo, pode ser desenvolvido por meio do aumento da população estudada e pela adição de novos marcadores. A aplicação de um índice na prática clínica auxilia a determinação do prognóstico de um dado indivíduo. Conclui-se que há correlação entre os níveis de expressão dos 5 marcadores e do gênero com o potencial metastático. E que é possível o desenvolvimento de um índice numérico que se relacione com o risco de ocorrer metástase.

Descritores: 1.TUMORCARCINÓIDE/classificação 2.TUMORES  
NEUROENDÓCRINOS/classificação 3.CARCINOMA  
NEUROENDÓCRINO/classificação 4.NEOPLASIAS  
BRÔNQUICAS/classificação 5.METÁSTASE 6.MARCADORES  
BIOLÓGICOSDETUMOR/classificação 7.MATRIZ  
EXTRACELULAR/classificação 8.NEOVASCULARIZAÇÃO PATOLÓGICA  
9.FATORES DE RISCO

## SUMMARY

Pereira JCN. *Study of the correlation between metastasis incidence in typical bronchopulmonary carcinoid tumors and clinical features, tissue biomarkers and index risk* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Typical carcinoid tumors are neuroendocrine cell's proliferations. If they are carcinomas or adenomas is still under discussion, due to their ambiguous behavior. It is imperative to define their malignant potential, intending to establish the adequate treatment. Metastasis reports demand a definition of which are the criteria that can be used to foresee the phenomenon. Nowadays it is used the classification proposed by Travis who stratifies the carcinoid tumors in typical and atypical. However, all typical carcinoid tumors, by this classification, are considered as being of low risk for metastatic spread, what turns insufficient this proposal to define therapeutic approach for all patients. Gender, age, the central or peripheral location, tumoral diameter and TNM stage, also have already been described as predictors of malignancy in carcinoid tumors. It looks for discovering other criteria that can be used to assist in the determination of the prognosis, like cellular and stromal biomarkers. The study of the cellular behavior based on biomarkers related to the malignant phenotype can be carried out using the immunohistochemical technique, as well as by the study of the extra cellular matrix. The analysis, for each patient, of the interaction between these phenomena, allows better definition of real metastasis risk. Like in other illness, it allows an index risk construction, pondering the contribution of each biomarker for the prognostic bedding. In spite to study the correlation between clinical features (gender, age, diameter and tumor localization - central or peripheral -, residual neoplasm in operative margins and TNM stage), biomarkers and the malignant potential of typical carcinoids, it was proceeded to the quantification of the immunohistochemical expression level of the proteins p53, ki-67 and Bcl-2, it was also measured the collagens fibers and elastic and microvessels density in tumoral stoma, and it was collected data from the medical charters. Nodal metastasis has been diagnosed in 9 of 55 patients, and haematogenic in 6 (liver: 2, bone:1, lung: 1, thyroid: 1, pericardial fat: 1). In 2 patients it was diagnosed both nodal and haematogenic metastasis. Univariate statistical analysis showed that all the 5 biomarkers (over expression of p53, Ki-67 and microvessels density and under expression of Bcl-2 and matrix fibers) and male gender are related to increased risk for metastasis. Age (older patients) was borderline only related to metastatic increased risk. Under multivariate analysis by multiple steps logistic regression, only microvessel density was independently related to metastasis. Perhaps, if it has been studied in a larger group of patients, other biomarkers could be implied in multivariate analysis in the equation for increased risk for metastatic disease. Based on univariate analysis for defining correlation between each biomarker, age group and gender with the metastatic phenomenon, it was composed a panel using the odds ratio for

each factor. It was proposed a practical model (to be developed by future research) for a numeric risk index directly proportional to the metastatic risk. The application of an index in the clinical practice assists the determination of the prognosis for each patient. It was concluded that there is a correlation between the expression levels of the 5 studied biomarkers and gender with the metastatic potential, and that is possible the development of a practical numeric risk index related to the metastatic risk.

**Key Words:** 1.CARCINOID TUMOURS/classification  
2.NEUROENDOCRINE TUMORS/classification 3.NEUROENDOCRINE  
CARCINOMA/ classification 4.BRONCHIAL NEOPLASMS/ classification  
5.METASTASIS 6.TUMOUR BIOMARKERS/classification  
7.EXTRACELLULAR MATRIX 8.PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS 9.RISK  
FACTORS

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

Acompanha-se diariamente, pela imprensa leiga, a incessante busca da cura do câncer pelos cientistas. O argumento de que “câncer” é um termo que engloba uma vasta gama de processos malignos, é suficiente para que o círculo médico busque melhor compreender o funcionamento das células neoplásicas. Porém, existem tumores que já carregam consigo o rótulo sombrio de “câncer”, e outros, que como uma dádiva dos Céus foram poupados de tal acusação. Ante estes últimos, predomina a reação de verdadeiro alívio ao diagnóstico, que contagia o paciente, e muitas vezes o próprio médico. No caso de algumas entidades patológicas, desfechos mórbidos ou mesmo letais alertam para o perigo de tal postura. O relato da ocorrência de metástase em pacientes operados por tumores carcinóides típicos broncopulmonares é um exemplo<sup>1-3</sup>.

Tão importante quanto a busca da “cura do câncer”, é o reconhecimento do potencial maligno de um tecido, quando se o tem, muitas vezes literalmente, às mãos; e ambas as tarefas tornam-se perigosamente difíceis nos casos de desconhecimento da fisiologia da célula tumoral. O estudo da biologia celular e molecular<sup>4</sup> veio esclarecer muitos dos fenômenos responsáveis pelo comportamento agressivo do “câncer”, aliando-se àqueles que procuram estabelecer diagnósticos e oferecer tratamentos mais eficazes para os que são acometidos pela doença.

Desde as primeiras menções feitas aos tumores carcinóides, começando pela denominação *karzinoid* (que parece câncer)<sup>5</sup>, até o crepúsculo do século XX, criou-se o mito de serem tumores benignos, adenomas, ou na pior das hipóteses, neoplasias bem diferenciadas. Se é verdade que aquilo que se chama hoje tumor carcinóide típico, quando comparado com outras entidades malignas, evolui de forma mais benigna para a maioria dos doentes, também é verdade que esse tumor é responsável pelo sofrimento, ou mesmo óbito, de uma parcela de pacientes. Se os termos adenoma e carcinoma bem, pouco ou mal diferenciado sobreviverão ou serão reutilizados não se sabe. Mas o que se deve saber, é que existe uma forma de tumor carcinóide típico que se comporta de forma agressiva, e que os critérios histológicos clássicos não conseguem detectar.

Na busca de critérios que possam auxiliar na tarefa de melhor classificar os tumores carcinóides típicos broncopulmonares, estabeleceu-se no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, um grupo assistencial e de pesquisa, que conta com profissionais vindos de outros hospitais e mesmo de outras cidades, com ambulatório e laboratório próprios. O grupo mantém como uma de suas linhas de pesquisa o estudo de marcadores intra e extracelulares na busca da criação de índices objetivos que possam ser correlacionados com o potencial metastático nestes tumores.

Este trabalho faz parte desse esforço, e contribuiu com o estudo da associação entre o índice de expressão dos marcadores: nucleares p53 e Ki-67; citoplasmático Bcl-2; fibras colágenas e elásticas matriciais, com o

potencial metastático em pacientes operados e acompanhados neste Serviço. Graças ao esforço conjunto dos integrantes do grupo, cada qual estudando diversos marcadores, inicia-se já um esboço, do que se espera, será um índice numérico de risco para a ocorrência de metástase.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

O tumor carcinóide bronco-pulmonar é neoplasia neuroendócrina derivada de células do epitélio ventilatório denominadas células de Kulchitsky<sup>6-8</sup>, e perfaz de 0,5 a 5%<sup>9, 10</sup> dos carcinomas primários do pulmão. Estudos epidemiológicos recentes demonstram progressivo aumento de seu diagnóstico nas últimas décadas<sup>11, 12</sup>.

É classificado em típico e atípico de acordo com o grau histológico de malignidade<sup>3, 13</sup>. O primeiro é considerado neoplasia de baixo grau de agressividade, sem potencial metastático, à distância ou linfonodal. Apesar disso, é cada vez mais freqüente o relato da ocorrência de metástase em indivíduos acometidos pela doença<sup>14-16</sup>.

Torna-se imperativo o estudo dessa entidade nosológica, para que se compreendam quais os mecanismos que proporcionam a estas células a capacidade de disseminação para linfonodos e outros órgãos, e somente assim definir qual o grupo de doentes que está sujeito a maior risco de sofrer tais conseqüências.

## 2.1 O ESPECTRO DE PROLIFERAÇÕES DE CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS BRONCOPULMONARES

Células neuroendócrinas estão presentes em todo o epitélio broncopulmonar, isoladas ou em grupo, sendo denominadas de células e corpos de Kulchitsky, respectivamente<sup>15, 17</sup>. Apesar de pouco freqüentes em qualquer segmento das vias aéreas, são localizadas preferencialmente nos brônquios principais e lobares, sendo mais raras nas regiões carinal e periféricas<sup>18, 19</sup>.

Possuem função de quimiorreceptores e são sensíveis a alterações das pressões parciais de gases, tanto alveolares quanto sangüíneas<sup>20</sup>. Proliferam-se em resposta às baixas concentrações de oxigênio ou às altas de gás carbônico<sup>21-23</sup>.

Hiperplasia de células neuroendócrinas pode ocorrer no tecido broncopulmonar adjacente a neoplasias, infecções ou a qualquer processo patológico que desencadeie resposta inflamatória<sup>24, 25</sup>. Não é conhecida a causa de tal fenômeno. Nestes casos, os patologistas descrevem estes aglomerados de células de Kulchitsky como "Tumorlets". Por definição, o maior diâmetro não deve ser maior que 5 mm, caso isto ocorra, passam a ser arbitrariamente denominados tumores carcinóides típicos<sup>26</sup>.

Todos os tumores carcinóides típicos são considerados verdadeiras neoplasias, mesmo que em alguns casos, não se observe qualquer característica indicativa de malignidade à análise histológica pela coloração pela hematoxilina-eosina.

Os tumores carcinóides atípicos são mais facilmente aceitos como sendo carcinomas<sup>1-3, 27</sup>, pois possuem características histopatológicas sugestivas de malignidade, como presença de áreas necróticas e ocorrência de duas ou mais figuras de mitose a cada 10 campos microscópicos com aumento de 400x (10 campos de grande aumento - CGA)<sup>13, 14, 16</sup>.

Proliferações neoplásicas com alto grau de malignidade também ocorrem, e compreendem os carcinomas neuroendócrinos de grandes e de pequenas células<sup>28, 29</sup>.

Não há evidência de que as hiperplasias sejam pré-malignas, ou de que haja progressão maligna de um grupo para outro mais agressivo. Existem evidências epidemiológicas de que cada grupo de proliferações é independente<sup>23</sup>, ressalva feita à polêmica existente na diferenciação entre hiperplasia de células de Kulchitsky e o tumor carcinóide típico<sup>30</sup>.

Tentativas para definir cada um dos grupos do espectro por meio de análise de material genético<sup>19, 31, 32</sup>, de proteínas celulares<sup>8</sup> ou de fenômenos extracelulares foram realizadas<sup>33</sup>. Porém, tão importante quanto definir os grupos e nomenclaturas, é atentar para o fato de que mesmo os tumores carcinóides típicos podem ter comportamento invasivo e metastático.

## 2.2 HISTÓRICO

Laënnec<sup>34</sup>, em 1831, ao desenvolver o estetoscópio e compilar um verdadeiro manual de como usufruir da inovação, foi quem fez a primeira descrição do que provavelmente teria sido um tumor carcinóide brônquico.

Descreveu detalhadamente a ausculta de um pulmão atelectasiado por uma lesão endoluminal de crescimento lento, gerando pneumonias de repetição e tosse com hemoptise, em uma mulher jovem não tabagista. Porém, o termo carcinóide foi forjado somente em 1907 por Oberndorfer<sup>5</sup> para descrever lesões tumorais que se assemelhavam morfológicamente a carcinomas, apesar de apresentarem comportamento menos agressivo, e que podiam ocorrer nos segmentos bronco-pulmonares ou no trato gastrointestinal. O primeiro relato, comprovado histologicamente, de tumor carcinóide, deve-se a Lubarsch<sup>35</sup>, em 1888, que descreveu dois casos de pacientes com múltiplos tumores em íleo distal, descobertos à necropsia.

Em todas essas descrições predomina o conceito de que os tumores carcinóides são tumores benignos e, apesar dos relatos de metástases no decorrer do século XX<sup>3</sup>, tal concepção perdurou até a década de 1980.

### **2.3 CLASSIFICAÇÕES DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE**

Na classificação anterior a 1981 proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tumores carcinóides brônquicos eram considerados adenomas, por acreditar-se que representavam neoplasias de malignidade intermediária entre os hamartomas e os carcinomas primários de pulmão. Porém, os relatos de comportamento metastático linfonodal e à distância exigiram reconsideração deste conceito<sup>36, 37</sup>.

Em 1982, a OMS<sup>38</sup> situa os tumores neuroendócrinos pulmonares entre neoplasias malignas, dividindo-os em dois grandes grupos: os tumores

carcinóides (típicos e atípicos) e os carcinomas pulmonares de pequenas células. Esta postura é mantida pela revisão de 1999 (Quadro AP1 – Apêndice A). As características histológicas que definem o diagnóstico de tumor carcinóide típico (CT) ou atípico (CA) ou carcinoma de pequenas células são relação volumétrica núcleo/citoplasma, número de mitoses em 10 campos de maior aumento, necrose, pleomorfismo e invasão vascular<sup>39</sup>.

## **2.4 TRATAMENTO DOS TUMORES CARCINÓIDES TÍPICOS BRONCOPULMONARES**

A conduta clássica para o tratamento dos tumores carcinóides é a ressecção cirúrgica<sup>40</sup>, variando-se da enucleação ou ressecções em cunha para os tumores carcinóides típicos<sup>41-44</sup> às ressecções de todo o território de drenagem linfática compartilhado pela lesão nos tumores carcinóides atípicos<sup>45, 46</sup>. Porém, a constatação de que mesmo as lesões bem diferenciadas (CT) podem apresentar metástases linfonodais e à distância em até 15% dos casos e mortalidade de até 10% em 5 anos<sup>10, 13, 14, 47-49</sup> desafia pesquisadores, clínicos e cirurgiões a identificarem a população de pacientes com tumores carcinóides típicos de maior malignidade e a propor abordagens terapêuticas mais eficientes. Discute-se, por exemplo, o papel de ressecções cirúrgicas ampliadas neste eventual subgrupo<sup>49, 50</sup>.

O conceito de que tumores carcinóides podem ter comportamento agressivo exige que, a partir do diagnóstico adequado de carcinoma, e não

adenoma<sup>37</sup>, defina-se em que grupo prognóstico o paciente encontra-se, e proceda-se ao tratamento adequado.

Quanto aos outros carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares, que não os tumores carcinóides típicos, é bem estabelecido que possuem potencial invasivo e metastático<sup>51</sup>. O comportamento dos tumores carcinóides atípicos é mais agressivo, gerando metástase para linfonodos mediastinais de 30 a 50% dos casos<sup>1-3, 27, 49</sup>. Outro grupo de tumores que integra o espectro de agressividade entre os tumores carcinóides típicos e o carcinoma neuroendócrino de pequenas células consiste nos carcinomas neuroendócrinos de grandes células<sup>13, 52</sup>. Até o momento, existe discussão quanto aos critérios de classificação para a diferenciação entre estes e os carcinomas de grandes células com diferenciação neuroendócrina<sup>28</sup>, mas de qualquer forma, ambas são neoplasias agressivas, havendo até classificações que as agrupam com os carcinomas pulmonares de pequenas células<sup>53</sup>, em um grupo denominado carcinomas neuroendócrinos de alto grau de malignidade<sup>54</sup>, em contrapartida aos de baixo grau (tumor carcinóide típico e atípico)<sup>29</sup>.

Considerando-se a revisão da nomenclatura, poder-se-ia deduzir que o uso do termo carcinoma ao invés de carcinóide culminou com a determinação do tratamento pela ressecção oncológica clássica utilizada para carcinomas pulmonares não neuroendócrinos, porém, isto não ocorreu, e ainda hoje se aceita a ressecção econômica (enucleação, ressecção em manga ou cunha), sem a dissecação linfonodal hilar e mediastinal ipsilateral para o tratamento do carcinoma neuroendócrino bem diferenciado (CT)<sup>43</sup>.

Ocorre, então, uma disparidade entre a nomenclatura e a conduta aceita nos centros especializados em oncologia pulmonar. Porém, se considerado como um grupo homogêneo, os tumores carcinóides típicos e atípicos realmente possuem comportamento menos agressivo que os outros carcinomas primários de pulmão (epidermóide, adenocarcinoma, de grandes e pequenas células). Para que haja concordância entre nomenclatura e conduta, ou incorre-se novamente no risco de considerar os CT e CA como adenomas, ou no risco de submeter doentes com lesões pouco agressivas a procedimentos ampliados desnecessários, em alguns casos com risco de morbidade adicional; ou então, deve-se determinar um método capaz de diagnosticar subgrupos de malignidade em tumores carcinóides.

Entre os métodos utilizados para a determinação de subgrupos de tumores com maior grau de agressividade, encontram-se as técnicas imunohistoquímicas<sup>4</sup> para detecção de proteínas envolvidas em fenômenos moleculares relacionados ao fenótipo maligno e técnicas de quantificação da densidade de fibras da matriz extracelular<sup>1</sup> que interferem com o potencial invasivo e metastático<sup>55, 56</sup>.

Moléculas intracelulares envolvidas no processo mitótico, como a proteína nuclear Ki-67<sup>57</sup>, no processo de perda do controle da atividade transcripcional, como a proteína p53 ou com a capacidade da célula entrar em apoptose, como a proteína citoplasmática Bcl-2, podem ser detectadas pela técnica de imunohistoquímica. Assim também, macromoléculas que compõem a matriz extracelular podem ser detectadas e sua quantidade mensurada, como o colágeno IV e as fibras elásticas.

O estudo destes fenômenos, como de tantos outros que ocorrem no ambiente intra ou extracelular, auxilia na determinação do verdadeiro comportamento maligno celular, e com isso, pode ser utilizado na prática clínica para classificar pacientes em subgrupos de prognóstico<sup>4, 58</sup>.

## **2.5 CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS DE AGRESSIVIDADE**

A utilização de critérios histopatológicos clássicos para a determinação do grau de agressividade pode não ser suficiente, pois alguns fenômenos biomoleculares relacionados ao potencial metastático ou invasivo, detectáveis por métodos imunohistoquímicos ou de análise morfológica ou fisiológica do genoma celular, não se traduzem precocemente no fenótipo histológico clássico do tumor<sup>4, 8, 16, 59, 60</sup>.

Para que as células de uma lesão neoplásica causem alterações mórbidas em seu hospedeiro, é imperativo que em alguma fase de seu desenvolvimento, cause pelo menos um dos três fenômenos: invasão ou compressão de estruturas adjacentes, metástase ou produção de substâncias que alterem o equilíbrio homeostático do indivíduo<sup>43</sup>.

Acreditou-se por muito tempo que a análise de critérios como atipia celular, presença de necrose e fração do número total de células apresentando figuras de mitose, seria suficiente para definir se o tumor pode ser considerado agressivo<sup>1-3, 27</sup>. A falácia decorre da conclusão de que um tumor não definido como maligno por estes critérios, é benigno<sup>49, 61</sup>.

O estudo de fenômenos intra ou extracelulares, tais como o potencial proliferativo de células que ainda não apresentam figuras de mitose<sup>29, 62</sup>, a integridade das proteínas de reparo do genoma<sup>63</sup>, a capacidade de indução de apoptose em células indiferenciadas malignas, a eficácia de células tumorais em progredir espacialmente através das fibras da matriz extracelular<sup>64</sup> e a eficácia com que o parênquima tumoral induz angiogênese, complementa a análise histológica clássica das neoplasias quanto a sua agressividade<sup>65-67</sup>.

## **2.6 TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS E DE ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR AUXILIAM NA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL INVASIVO E METASTÁTICO**

### **2.6.1 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE FENÔMENOS INTRACELULARES**

#### **2.6.1.1 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA NUCLEAR Ki-67**

Os critérios mais utilizados para a diferenciação entre tumores carcinóides típicos e atípicos são a presença de necrose e o número de figuras de mitose à coloração pela hematoxilina-eosina<sup>68</sup>.

Se houver presença de áreas de necrose ou se o número de figuras de mitose ultrapassar dois a cada 10 campos de grande aumento (400x), considera-se o diagnóstico de tumor carcinóide atípico<sup>37, 69</sup>.

A relação entre o número de células que estão em processo de proliferação e o número daquelas em repouso, é um parâmetro classicamente utilizado para classificar neoplasias em graus de malignidade<sup>70</sup>. Tumores agressivos possuem elevada atividade mitótica<sup>29</sup>.

Além da contagem direta do número de células em divisão à microscopia óptica, a determinação da capacidade proliferativa tecidual pode ser realizada por outros métodos, divididos nos imunohistoquímicos e nos não imunohistoquímicos. Entre estes, os mais utilizados são a marcação pela timidina tritiada (T [H3]), das regiões organizadoras de nucléolo pela prata (AgNOR) e a citometria de fluxo.

Técnicas de imunohistoquímica detectam a presença de marcadores de proliferação celular<sup>71</sup>. Anticorpos contra proteínas nucleares como o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e o Ki-67 são utilizados com esse intuito<sup>72-74</sup>.

Segundo o Professor Venâncio Alves<sup>4</sup>, patologista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o Ki-67, é considerado como o melhor marcador operacional da proliferação celular para o patologista cirúrgico.

A inclusão do estudo deste marcador em qualquer análise que vise à diferenciação entre grupos de malignidade, no espectro de neoplasias derivadas das células de Kulchitsky, justifica-se devido à bem estabelecida

correlação entre o índice mitótico e o comportamento agressivo nos carcinomas neuroendócrinos<sup>75</sup>.

### **2.6.1.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA NUCLEAR p53**

A proteína nuclear p53 é considerada "o guardião do genoma"<sup>76</sup> por ter capacidade de detectar danos à molécula de DNA que comprometem a integridade celular<sup>77, 78</sup>. Ao detectá-los, a ativação do p53 desencadeia uma série de eventos que culmina com o reparo da lesão ou com a indução da célula a entrar em apoptose<sup>55, 79</sup>.

É necessário que o p53 esteja presente na sua forma ativa para que desempenhe tal função<sup>80-82</sup>, porém, mutações podem ocorrer à região do DNA que codifica a proteína, e algumas delas alteram a estrutura molecular em pontos chave, de forma que o p53 torna-se inativo<sup>83</sup>. O p53 mutado e inativo, não sendo mais eficaz na vigilância dos processos de duplicação e transcrição, concorrem para que fenômenos oncogenéticos obtenham êxito<sup>82, 84, 85</sup>.

A determinação da funcionalidade da proteína p53 pode ser feita de forma direta, estudando sua estrutura terciária e sua atividade, porém não há aplicação clínica de tais estudos até o momento. Outro método seria o seqüenciamento do RNAm que será traduzido em p53, mas também não é realizado de rotina na prática clínica<sup>86</sup>. Em uso rotineiro nos laboratórios de patologia está a determinação da expressão imunohistoquímica do p53<sup>55, 63</sup>,

baseando-se no fato de que a proteína mutante, e portanto supostamente inativa, possui vida média mais prolongada que a forma selvagem e ativa. Níveis elevados de expressão imunohistoquímica do p53 estão relacionados à presença de população de moléculas mutadas, e inativas<sup>62, 87</sup>.

### **2.6.1.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA CITOPLASMÁTICA Bcl-2**

A todo momento, em indivíduos pluricelulares, originam-se células com características neoplásicas, porém, mecanismos de auto-controle evitam que estas se proliferem e desenvolvam massas tumorais<sup>55</sup>. Um dos mecanismos é a indução destas células à morte programada. As células podem morrer por apoptose, anóikis ou necrose<sup>88</sup>. A proteína citoplasmática Bcl-2 participa do fenômeno de apoptose, ou morte celular programada.

O processo apoptótico tem por objetivo a eliminação de células que por algum motivo sejam desnecessárias ou lesivas ao equilíbrio tecidual<sup>89</sup>. Células desnecessárias são aquelas que foram substituídas por outras recém formadas e diferenciadas, e que se permanecessem no tecido seriam redundantes, ou então células que devem desaparecer no processo embriogênico para a formação de fendas, sulcos e orifícios.

O melhor exemplo de células lesivas são aquelas que não possuem mais comportamento adequado para viver em harmonia com suas vizinhas teciduais e perderam a capacidade de seguirem o ciclo celular de forma fisiológica, por lesão do DNA, em outras palavras, as células neoplásicas.

Ainda que uma célula sofra lesões em seu DNA podendo dar origem a uma neoplasia, existem processos de reparo do material genético, como já visto por exemplo, através do p53<sup>84</sup>. Se não for possível alcançar novamente a homeostasia celular, e esta se tornar instável geneticamente a ponto de ameaçar a integridade tecidual, o próximo mecanismo de defesa contra o desenvolvimento de tumores malignos, é a auto indução à apoptose<sup>55</sup>.

O processo apoptótico envolve diversas macromoléculas em cascata, sendo indispensável a participação das proteínas da família do Bcl-2, como a Bax e Bak<sup>90</sup>, além das pertencentes à família das asparaginases da porção C-terminal, as C-asparaginases (ou caspases)<sup>91, 92</sup>. Estas e outras moléculas que tomam parte no processo são produzidas em maior quantidade quando a apoptose é desencadeada. É possível quantificar o nível de expressão destas moléculas pela técnica de imunohistoquímica. A quantificação do Bcl-2 é realizada de rotina pelos laboratórios de patologia, pois o marcador é conhecido desde o final da década de 80, e utilizado desde o início dos anos 90.

A proteína Bcl-2 interage com outras moléculas, principalmente com a Bax, formando estruturas quaternárias diméricas que regulam a liberação de citocromos do interior das mitocôndrias<sup>90</sup>. A célula entra em apoptose somente após a presença das moléculas de citocromo-C no citoplasma<sup>93</sup>. O equilíbrio entre Bcl-2 e Bax determina se o processo de liberação destes será bloqueado ou deflagrado. Se o Bcl-2 sobrepõe-se em número de unidades ao Bax, os citocromos tendem a permanecer no interior mitocondrial, e se o Bax predomina, tendem a sair da organela<sup>94</sup>. O

processo de aumento da permeabilidade da membrana da mitocôndria ao citocromo C, oferece-lhe passagem livre para que atinja o citoplasma, e, a partir deste momento, toda e qualquer estrutura celular será desmontada ou digerida, e a célula desaparecerá ao ser fagocitada no local de sua morte.

## **2.6.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE FENÔMENOS EXTRACELULARES**

Não se pode conceber a matriz extracelular como uma entidade inerte sobre a qual as células desenvolvem suas atividades. Este ambiente é vivo, e não serve apenas como substrato anatômico, está em constante transformação, interagindo com células do parênquima de tecidos sadios e patológicos<sup>95-97</sup>.

O fenômeno também ocorre em tecidos tumorais malignos<sup>79</sup>. Interações entre a matriz e a célula neoplásica são indispensáveis para a determinação do potencial invasivo e metastático<sup>98, 99</sup>. Além disso, macromoléculas matriciais, como o colágeno tipo IV, a laminina, fibras elásticas ou a fibronectina, exercem função de verdadeiras barreiras à invasão neoplásica através da membrana basal<sup>1, 100-103</sup>.

O rompimento desta é o primeiro fenômeno<sup>98</sup> observado no deslocamento de células invasivas rumo aos tecidos adjacentes, com seus vasos sanguíneos e linfáticos, além de estruturas nervosas<sup>104</sup>.

Na matriz extracelular, além de macromoléculas que formam seu arcabouço, encontram-se as estruturas vasculares. A formação de vasos

sangüíneos e linfáticos é estimulada por mediadores produzidos pelas células neoplásicas, e é indispensável para a nutrição tumoral, assim como para a ocorrência do fenômeno metastático<sup>105</sup>. Daí decorre a necessidade do estudo da angiogênese, além das macromoléculas da matriz extracelular nas lesões malignas.

### **2.6.2.1 ANGIOGÊNESE**

Angiogênese é o processo de formação de vasos sangüíneos e linfangiogênese é a formação de vasos linfáticos<sup>106</sup>. Bem estabelecido é a necessidade dos tecidos neoplásicos malignos de produzir vasos sangüíneos arteriais para suprir seu aporte metabólico e de vasos venosos para drenar seus resíduos<sup>107, 108</sup>. Quanto maior a capacidade do parênquima tumoral em induzir a angiogênese, maior seu potencial para progredir em volume e gerar metástase<sup>109-112</sup>.

Modelos experimentais em camundongos demonstram que células do mesmo clone tumoral, sem capacidade de gerar metástase em situações de escassez de vasos sangüíneos ou linfáticos em sua proximidade, o fazem na presença destes<sup>105</sup>. Demonstrou-se também que, além de atingir, invadir e sobreviver na luz vascular, podem implantar-se em tecidos de linfonodos ou órgãos à distância.

Também é possível demonstrar, que tumores que não apresentam necrose, cujas células não são bizarras e têm baixa incidência de figuras de mitose, sendo, portanto classificados como de baixo poder metastático,

podem produzir substâncias angiogênicas para vasos sanguíneos e linfáticos, como o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF)<sup>113</sup>. Com isso, induzem a angiogênese em seus arredores, o que consiste em um dos fatores necessários para o desenvolvimento de metástase<sup>105, 107</sup>.

Uma forma de quantificar a angiogênese é a utilização de anticorpos contra as células endoteliais dos vasos sanguíneos em tecidos parafinados, e identificá-los pela técnica de imunohistoquímica<sup>112</sup>. O marcador de angiogênese mais utilizado de rotina em laboratórios de patologia é o CD-34 (catepsina D-34).

O estudo do fenômeno angiogenético tumoral é um exemplo de interação entre os marcadores celulares e estromais, pois o tecido tumoral ao se proliferar (fenômeno estudado pela marcação do Ki-67 ou do PCNA), necessita de maior aporte sanguíneo e produz fatores que estimulam a formação de vasos (marcados por imunohistoquímica pelo VEGF)<sup>105</sup>, ao mesmo tempo em que secreta enzimas que degradam a matriz para que as células neoplásicas possam progredir pelo estroma em direção aos vasos neoformados. Porém, a degradação enzimática dos componentes do interstício, expõe fragmentos de fibras colágenas (mensuradas por métodos morfométricos) e favorece o contato destas com moléculas transmembranáceas celulares, transduzindo-se o sinal de forma a inibir a liberação de moléculas indutoras de angiogênese<sup>106, 114</sup>. A diminuição do processo angiogenético culmina com a diminuição do aporte sanguíneo ao parênquima maligno, e com isso algumas células tendem a entrar em

apoptose<sup>55</sup> (que pode ser estudada do pela marcação imunohistoquímica do Bcl-2, Bax, Bak, caspases, smacks, DIABLO, FAS, etc.).

Se as células não morrerem, sob o efeito da hipóxia, voltam a produzir e secretar fatores que estimulam novamente a angiogênese<sup>115</sup>.

### 2.6.2.2 FIBRAS COLÁGENAS

O colágeno tipo IV é o principal componente da membrana basal<sup>98</sup>, estrutura que determina o limite entre o espaço ocupado pelo estroma tumoral e o preenchido pela matriz extracelular<sup>98, 116</sup>. Enquanto as células neoplásicas não ultrapassarem a membrana basal, não são consideradas invasivas<sup>1</sup>, além de não tomarem contato com estruturas vasculares sangüíneas ou linfáticas, não podendo, por conseguinte, gerar metástase por estas vias<sup>96, 100, 117</sup>. A interposição entre a malha de fibras colágenas e tecidos são também diminui a capacidade das células atingirem e invadirem estruturas adjacentes<sup>117</sup>.

Estudos recentes demonstram que o colágeno tipo IV que envolve o parênquima tumoral também tem capacidade antiangiogênica. O fenômeno ocorre mais precisamente quando enzimas produzidas pela célula neoplásica iniciam o processo de degradação da membrana basal. A ação enzimática expõe domínios da fibra colágena<sup>118</sup>, e a interação entre estes fragmentos e o componente extracelular das macromoléculas transmembranáceas celulares resulta na diminuição do sinal pró-angiogênico celular<sup>4</sup>.

### 2.6.2.3 FIBRAS ELÁSTICAS

O pulmão é um órgão rico em fibras elásticas<sup>116</sup>. Estas, localizadas no compartimento extracelular fazem parte da malha de macromoléculas que o compõem, juntamente com os colágenos, a laminina, a fibronectina, os perlecanos, e tantos outros<sup>119</sup>.

A manutenção da matriz, pela produção e remodelação de seus componentes, é realizada por células nela residentes, como os fibroblastos, mas também pelos componentes celulares dos epitélios adjacentes<sup>120</sup>. Nos tecidos saudáveis, o equilíbrio entre produção e reabsorção remodela de forma homeostática tal estrutura. Porém, o desequilíbrio causado por aumento ou diminuição em qualquer dos processos de manutenção, resulta em desaparecimento ou acúmulo de componentes matriciais<sup>102, 121, 122</sup>. A cicatrização é o modelo mais bem conhecido, com deposição de fibras e fibroblastos na área reparada<sup>116</sup>.

Neoplasias também causam desbalanço entre a produção e reabsorção de fibras da matriz<sup>122-124</sup>. O comportamento do parênquima maligno pode resultar no acúmulo ou na diminuição destes componentes<sup>103</sup>. Em alguns casos, células com poder de produzir enzimas capazes de digerir colágenos, fibras elásticas, heparan sulfatos, laminina, ou qualquer outra macromolécula que estiver em sua proximidade<sup>125</sup>, abrem caminho através dos tecidos, caracterizando um fenótipo invasivo<sup>103, 126, 127</sup>. Em outros casos, a reação do interstício que circunda o tumor provoca o anabolismo de novos componentes da malha extracelular<sup>122, 124, 128</sup>. Bons exemplos do fenômeno

são as fibras colágenas e elásticas, observadas ao redor dos chamados carcinomas com reação tecidual desmoplásica e elastóticas, respectivamente. Isso explica e desmascara o mito da malignização da cicatriz, pois estudos recentes demonstram que a cicatriz é mais recente que o componente carcinomatoso<sup>122</sup>, provando ser a reação desmoplásica ou elastótica consequência e não causa do processo neoplásico<sup>123, 129, 130</sup>.

As reações desmoplásicas e elastóticas observadas em diversos tipos de tumores malignos têm significado diverso. No caso do pulmão, têm correlação com o prognóstico<sup>131</sup>.

A quantificação das fibras elásticas pode ser realizada, para estudo do fenômeno da elastose<sup>122, 123</sup>, que consiste no depósito focal destas fibras. Fukushima<sup>102</sup>, em 2000, correlacionou-o com melhor prognóstico em carcinomas primários do pulmão. Em carcinomas de outras localizações, como o de mama, a elastose já foi correlacionada com o grau de diferenciação e invasão<sup>126, 128</sup>.

#### **2.6.2.4 DENSIDADE ESTROMAL**

Dado que tanto as fibras colágenas como as elásticas estão envolvidas no processo de contenção da livre movimentação das células tumorais pelo tecido, a soma das densidades destas macromoléculas foi considerada no estudo. Introduziu-se o termo densidade estromal para definir a característica.

## 2.7 ÍNDICES DE RISCO

A definição de condutas terapêuticas baseia-se no binômio diagnóstico-prognóstico. Ante a identificação de uma entidade nosológica (diagnóstico), e o conhecimento de sua história natural (prognóstico), os médicos estabelecem uma programação terapêutica.

A apresentação clínica heterogênea de uma doença, ou mesmo de várias, considerada sob uma única denominação diagnóstica, exige que se estabeleçam subgrupos de indivíduos de acordo com seus possíveis prognósticos.

A classificação de grupos de prognóstico é efetuada por meio do estudo da incidência e ou prevalência de eventos mórbidos decorrentes da doença em questão. No caso de neoplasias, podem-se citar como eventos, a invasão de órgãos pelo tumor, ocorrência de metástase ou óbito.

Existem índices de risco bem estabelecidos em medicina, como por exemplo, a escala numérica de Glasgow<sup>132</sup>, que representa o nível da quantidade e da qualidade de consciência em neurologia. É amplamente difundido entre os serviços de atendimento ao paciente traumatizado, e utilizado como um descritor da gravidade do neurotrauma e como indicador prognóstico. Para a determinação do índice numérico na escala de Glasgow de um doente específico, somam-se os valores obtidos pela verificação de 3 respostas a estímulos verbais ou dolorosos: abertura ocular, melhor resposta motora e melhor resposta verbal. Para cada um dos três itens, existe um valor numérico que representa o desempenho do paciente. Somam-se os

três valores e obtêm-se um índice que oscila de 3 a 15, sendo 3 o menor nível de consciência neurológica e o 15 a representação de um indivíduo vigio e orientado.

Outros exemplos são os índices de risco de complicações pós-operatórias, como o Índice de Risco Cardíaco<sup>133, 134</sup>, o Índice de Risco Pulmonar ou o Índice de Risco Cardiopulmonar<sup>135, 136</sup>, derivado dos dois primeiros. Para a definição do prognóstico de pacientes com carcinoma pulmonar não pequenas células existe Índice Prognóstico para Pacientes com CPNPC Inoperável<sup>137</sup>, cujos valores numéricos de 0 a 6, representam respectivamente os indivíduos com maior e menor tempo de sobrevivência.

Os fatores relacionados com a mortalidade (risco de óbito) utilizados para a determinação do Índice Prognóstico para Pacientes com CPNPC Inoperável são: sintomas, estadiamento, performance status, concentração sérica de hemoglobina e maior diâmetro tumoral.

No caso dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares, utilizam-se dois critérios (ambos histopatológicos) para a classificação dos doentes em dois grupos diagnósticos, com intuito prognóstico. O primeiro critério é a contagem do número de figuras de mitose entre as células tumorais observadas à microscopia óptica, e o segundo é a verificação da presença de áreas de necrose no tecido neoplásico<sup>36, 138</sup>.

A presença de 3 ou mais figuras de mitose em 10 CGA, à coloração pela HE, ou a presença de necrose, definem o diagnóstico de tumor carcinóide atípico. A ausência dos dois critérios é obrigatória para a definição do diagnóstico de tumor carcinóide típico. Pacientes com a variante

típica apresentam menor risco de ocorrência de metástase e maior tempo de sobrevivência.

O diagnóstico de metástases linfonodais e à distância e a existência de óbitos relacionados ao tumor carcinóide típico broncopulmonar, exigiram a busca de critérios complementares para a determinação de grupos de pacientes segundo o prognóstico.

Entre os critérios sugeridos como fatores prognósticos estão: gênero, idade, localização central ou periférica do tumor, comprometimento neoplásico da margem de ressecção cirúrgica maior diâmetro da lesão e estadiamento TNM, além do já bem estabelecido critério histológico (típico ou atípico).

O estudo da correlação de cada um destes 7 critérios clínicos com a incidência de metástase linfonodal ou à distância, pode ser um meio utilizado para a determinação de um índice numérico de risco para a ocorrência do fenômeno.

O estudo de critérios histopatológicos tumorais, tais como: a taxa de proliferação celular, a mutação da proteína nuclear p53, a tendência das células a entrar em apoptose, a angiogênese e a composição da matriz extracelular podem auxiliar na compreensão da fisiopatologia da célula maligna. Assim, pode-se estudar a correlação de cada um destes critérios com a incidência de metástase, e utilizá-los na determinação do índice.

O desenvolvimento de um índice que represente o risco da ocorrência de metástase em tumores carcinóides típicos, permite a classificação dos pacientes em grupos prognósticos. O tratamento de pacientes com tumores

de maior risco de acometer linfonodos regionais ou órgãos à distância, não deve ser o mesmo oferecido para indivíduos com proliferações benignas, sem capacidade invasiva ou metastática.

### **3. OBJETIVOS DO ESTUDO**

### 3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

1. Verificar se existe correlação entre a incidência de metástases e o nível de expressão de cada biomarcador tecidual estudado.
2. Verificar se existe correlação entre a incidência de metástase e:
  - gênero;
  - idade;
  - localização (central ou periférica) da lesão;
  - diâmetro do tumor;
  - margem cirúrgica comprometida por neoplasia;
  - estadio TNM.
3. Verificar a possibilidade de estabelecimento de um índice numérico que represente o risco da ocorrência de metástase para cada doente.

## **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Em uma população de doentes tratados de tumor carcinóide típico broncopulmonar, estudou-se a correlação entre variáveis clínicas, o nível de expressão de biomarcadores teciduais e a ocorrência de metástase por meio de estudo retrospectivo de corte transversal. Para tanto, realizou-se revisão dos prontuários e análise dos espécimes obtidos da ressecção tumoral.

O presente estudo (Protocolo de Pesquisa SDC-2243/03/37) teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14 de maio de 2003, conforme documentação apresentada no Apêndice B.

### **4.1 CASUÍSTICA**

A presente casuística constitui-se de material obtido a partir de 55 pacientes operados para tratamento de tumores carcinóides típicos broncopulmonares. Obteve-se, de forma retrospectiva, os dados dos indivíduos atendidos, operados e acompanhados no Serviço de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardiopneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1981 a 1999.

Inicialmente, foi realizada revisão dos prontuários dos pacientes com diagnóstico de adenoma brônquico, tumor carcinóide broncopulmonar e carcinoma neuroendócrino pulmonar, recuperados da Divisão de Arquivo Médico do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os dados obtidos foram: gênero, idade no momento do ato operatório, localização do tumor em relação à carina (central ou periférico), diâmetro da lesão, comprometimento da margem cirúrgica, estadiamento e TNM segundo a UICC<sup>139</sup>, ocorrência de metástases linfonodais, bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia em relação ao total dissecado, e/ou à distância (local do acometimento e tempo de seguimento livre de doença) e sobrevivência ou ocorrência de óbito.

O levantamento dos dados de seguimento ou que eventualmente não constavam nos prontuários disponíveis foi completado por meio da convocação dos pacientes, comunicação pessoal, visitas domiciliares e/ou questionários enviados aos familiares enfocando dados relacionados à recidiva, metástase à distância e óbito.

Como critérios de inclusão, utilizou-se a confirmação do diagnóstico histológico do tumor primário, disponibilidade de dados referentes ao estadiamento TNM, seguimento de 5 anos completos e exame de tomografia computadorizada de tórax ao final desse período. A verificação do estadiamento linfonodal foi obtida pela revisão histológica dos linfonodos ressecados e ausência radiológica ou intra-operatória do aumento do volume dos mesmos. Considerou-se dado satisfatório para a determinação da

presença de metástase à distância, a confirmação histológica do diagnóstico de carcinoma neuroendócrino na lesão metastática; e ausência, a descrição em prontuário, realizada por cirurgião torácico, da ausência de sinais, sintomas ou evidência do fenômeno em método diagnóstico por imagem.

Foram excluídos os portadores das Síndromes de Neoplasias Endócrinas Múltiplas, pois a ocorrência das lesões em diversos órgãos poderia representar metástase ou segundo foco primário, e também os indivíduos cujo diagnóstico foi de tumor carcinóide atípico ou carcinoma neuroendócrino de grandes células segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde de 1999<sup>37</sup>.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO**

Foram coletados todos os espécimes de tumores primários, e dos linfonodos e metástases ressecados.

Todo o material encontrava-se incluído em blocos de parafina tamponada, após fixação prévia em formalina 10%. Cada um deles foi processado, primeiramente, para diagnóstico histológico.

Cortes histológicos de 3 µm de cada bloco foram montados sobre lâminas e corados por hematoxilina-eosina. Estas foram revistas separadamente e de forma aleatória por dois patologistas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com

expressiva experiência na análise de carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares. Os casos nos quais o diagnóstico foi de tumor carcinóide atípico, de carcinoma neuroendócrino de grandes e pequenas células, foram excluídos do estudo. Nenhum dos patologistas conhecia o diagnóstico prévio referente às lâminas analisadas.

Apenas foram incluídos no estudo os casos nos quais houve, obrigatoriamente, concordância no diagnóstico de tumor carcinóide típico pelos dois patologistas.

A classificação do tipo de tumor neuroendócrino foi realizada nas áreas mais representativas, identificadas após análise de pelo menos 10 campos microscópicos a uma ampliação de 250x. Já a classificação histológica obedeceu os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde<sup>39</sup>, baseado no padrão predominante identificado, cujos critérios são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos**

Tumor	Diâmetro da célula (µm)	Necrose	Mitoses (10 CGA)	Contorno Nuclear	Nucléolo
Tumor Carcinóide Típico	50-70	0	≤ 2	Regular (0)	Ausente (0)
Tumor Carcinóide Atípico	40-50	+ a ++	3 a 9	Irregular (+)	Ausente/ Presente (0 a +)
Carcinoma de Grandes Células	40-60	++ a +++	>10	Irregular (+ a ++)	Ausente/ Presente (+ a +++)
Carcinoma de Pequenas Células	15-30	++ a +++	>10	Irregular (+++)	Ausente/ Presente (0 a +)

Travis WD et al<sup>39</sup>, 1998.

As lâminas relativas aos linfonodos extraídos e aos tecidos tumorais metastáticos, também foram analisadas pelos dois patologistas para verificação do estadiamento. Da mesma forma, foram incluídos somente os casos nos quais houve necessariamente a concordância dos dois patologistas.

Após essa seleção as lâminas obtidas a partir dos blocos dos 55 pacientes escolhidos, foram preparadas para a marcação imunohistoquímica para CD-34, Bcl-2, Ki-67, p53, e para quantificação de fibras elásticas e colágenas.

#### **4.2.2 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO**

##### **4.2.2.1 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA EMPREGADA NA DETECÇÃO DOS ANTÍGENOS CD-34, Bcl-2, Ki-67 e p53**

Os blocos selecionados foram submetidos a cortes histológicos de 3 µm de espessura com o uso de um micrótomo e o tecido colocado sobre lâmina de microscopia, sem realização de coloração.

Estas foram então submetidas ao seguinte processo de silanização: primeiramente foram mergulhadas em uma cuba com álcool, em duas com acetona e depois em mais duas com silane (SIGMA A3648) por 5 minutos, respectivamente. O procedimento terminou com mais dois banhos em duas cubas com acetona e em seguida em duas com água destilada.

A técnica de imunohistoquímica aplicada seguiu o seguinte protocolo<sup>116</sup>: primeiramente as lâminas foram desparafinizadas (permaneceram 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de três banhos de xilol a temperatura ambiente). Em seguida, o tecido foi hidratado por submersão em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente, lavado em água corrente e depois em água destilada e deionizada. O próximo passo foi a recuperação antigênica realizada em panela a vapor na qual colocou-se o berço com as lâminas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 à 95-100°C. Após 35 minutos, a cuba com as lâminas permaneceu por 20 minutos à temperatura ambiente para esfriar e em seguida foi lavada em Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 7,2-7,4 (PBS) três vezes por 3 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%), sete vezes por 5 minutos, seguido de lavagem em água corrente, em água destiladas e em PBS, respectivamente, três vezes por 3 minutos. Seguiu-se então com o bloqueio de sítios inespecíficos colocando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente.

Diluíram-se então os seguintes anticorpos primários (cada um em um recipiente distinto) em Soro Albumina Bovina (BSA), Sigma: CD-34 diluição 1:25 (Novocastra Laboratory, Newcastle, United Kingdom), Bcl-2 diluição 1:80 (Dako A/S, Copenhagen, Denmark), antígeno nuclear Ki-67 diluição 1:400 (MIB1; Immunotech, Marseille, France) e uma proteína monoclonal anti-humana p53 diluição 1:40 (DO7; Dako A/S, Copenhagen, Denmark).

Todas as lâminas foram cobertas com 100  $\mu$ L dessas soluções e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas.

Após esse período de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes por 3 minutos e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário LSAB-HRP (*Large Streptavidin-Avidin-Biotin – System Peroxidase*; k-0690; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), comercializado já pronto para uso, que segue a seguinte seqüência de utilização: primeiramente incubou-se o anticorpo secundário por 1 hora a 37°C, e lavou-se as lâminas em tampão PBS que a seguir foram incubadas pela Estreptoavidina-Biotinilada Peroxidase por 45 minutos a 37°C.

Procedeu-se então a revelação, após três banhos de 3 minutos em PBS, na qual as lâminas foram colocadas no cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100mg em 70 mL de PBS + 3 mL de água oxigenada; Sigma Diagnostics, St. Louis, USA), por 5 minutos, lavadas em água corrente por mais 5 minutos, contracoradas em hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente por 5 minutos para serem desidratadas em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto e em solução de xilol três vezes, respectivamente. As lâminas foram finalmente montadas com lamínula e Entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Para controle positivo, corado simultaneamente às reações descritas, utilizou-se fragmento de carcinoma neuroendócrino de pulmão, que é sabidamente positivo para os anticorpos primários. Para controle negativo, os mesmos cortes foram incubados com BSA, sem adição de anticorpo.

#### 4.2.2.2 TÉCNICA EMPREGADA NA COLORAÇÃO DAS FIBRAS ELÁSTICAS E COLÁGENAS

A coloração para as fibras elásticas foi executada pelo método Weigert Resorcina-Fucsina modificado, com uma oxidação prévia que cora os três tipos de fibras do sistema elástico (oxitalânicas, elaunínicas e fibras elásticas completamente desenvolvidas), mas que não permite identificá-las separadamente. Tal coloração segue o seguinte protocolo: primeiramente as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas da maneira convencional (como já mencionado na técnica imunohistoquímica). Em seguida, sobre os cortes, depositou-se uma solução aquosa de Oxona 10% (DuPont, Delaware, USA) por 40 minutos para promover a oxidação. Posteriormente, lavou-se em água corrente por 5 minutos e, em seguida, com álcool 70 e 95%, respectivamente. Foi então realizada a coloração pela Resorcina-Fucsina de Weigert por 1 hora à temperatura ambiente, seguida por 5 minutos de lavagem em água corrente e de duas trocas de 10 minutos em álcool 70%. A coloração de fundo foi removida com uma passagem em solução álcool-ácido a 1% (1 de HCl para 99 de álcool 70%) e posterior lavagem em água corrente. Finalmente, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas.

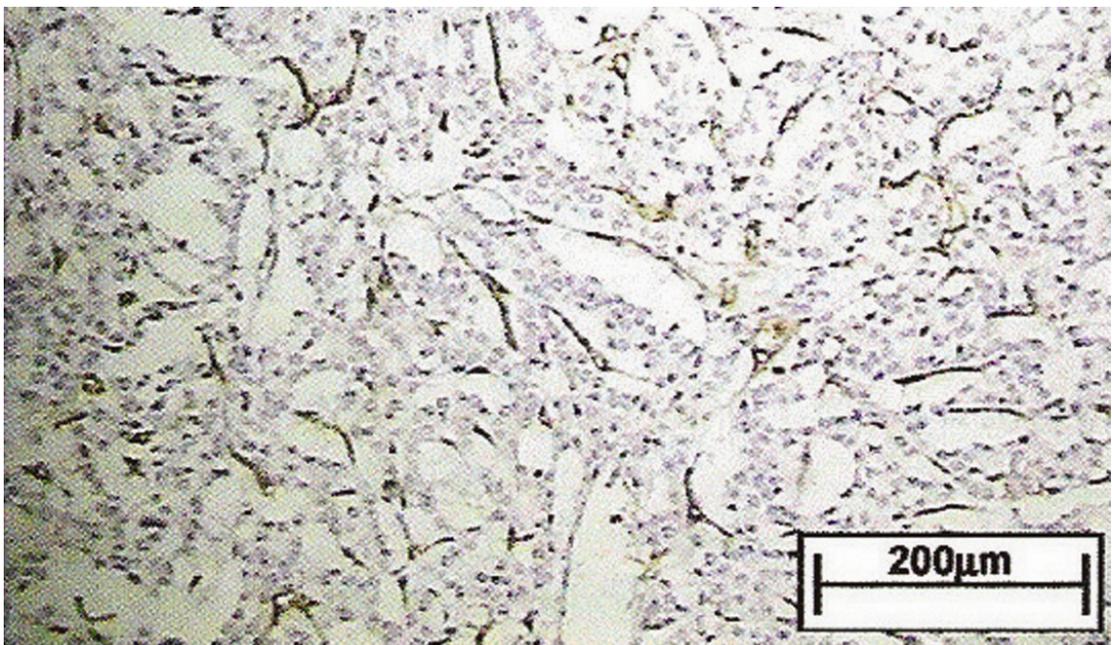
A coloração para as fibras colágenas foi efetuada segundo a técnica de Picrossírius sem hematoxilina, permitindo a sua quantificação. Utilizou-se uma solução de Sirius Red 0,2% (Direct Red 80, CI 35780, Wisconsin, USA) dissolvida em conteúdo aquoso saturado por ácido pícrico, incubada por 1

hora à temperatura ambiente. A acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de Picrossírius-Polarização é específica para estruturas colágenas composta por agregados de moléculas orientadas.

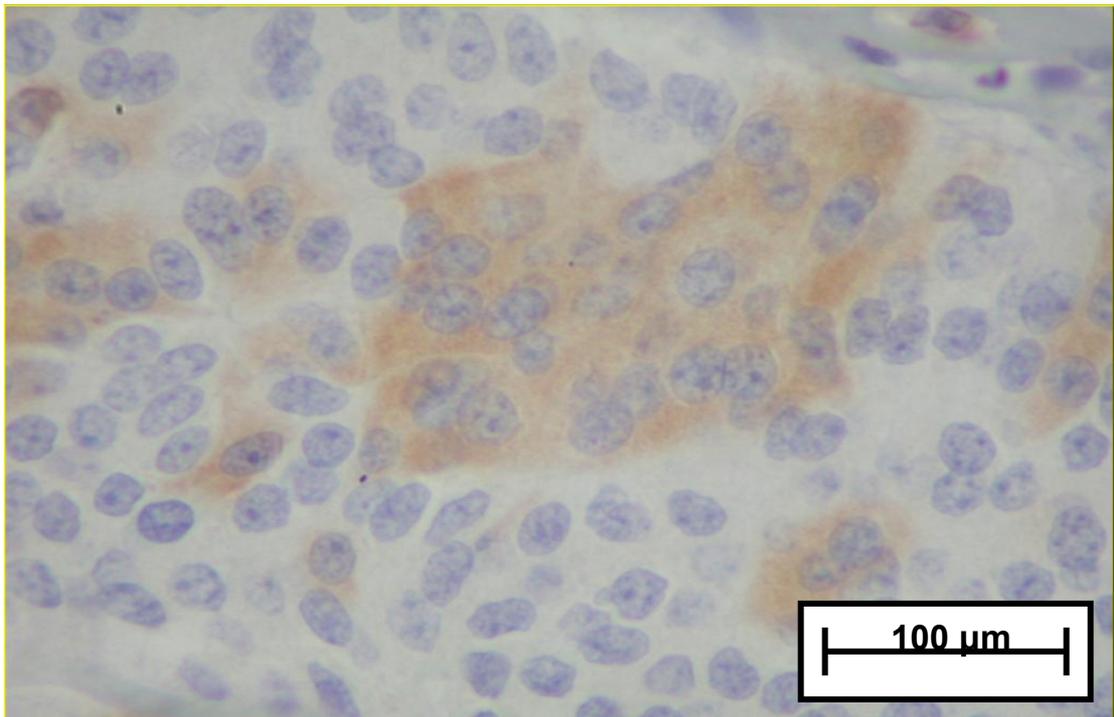
#### 4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO ENCONTRADA

##### 4.2.3.1 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES IMUNOHISTOQUÍMICOS

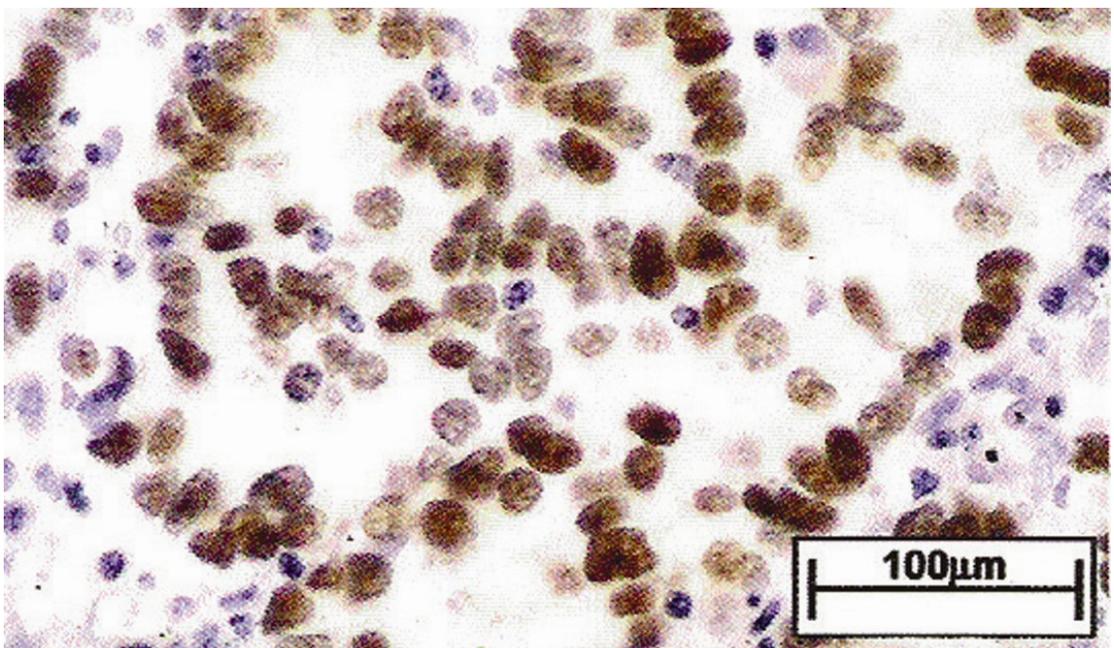
A coloração castanha foi considerada como uma evidência da expressão dos antígenos nas células, de acordo com os anticorpos utilizados (CD-34, Bcl-2, Ki-67 e p53), conforme detalhado nas Figura 1, 2, 3 e 4, respectivamente.



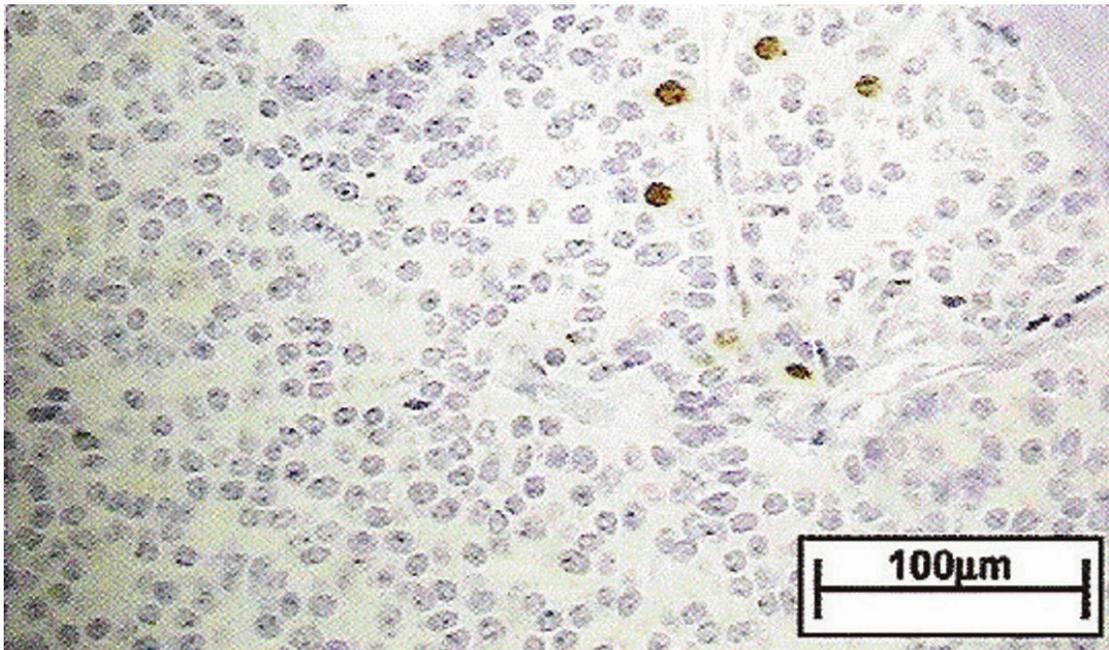
**Figura 1 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para CD-34 em aumento de 200x. Nota-se coloração castanha nas células endoteliais (Caso nº 9).**



**Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Bcl-2 em aumento de 400x. Nota-se coloração castanha nos citoplasmas das células neoplásicas (Caso nº 9).**

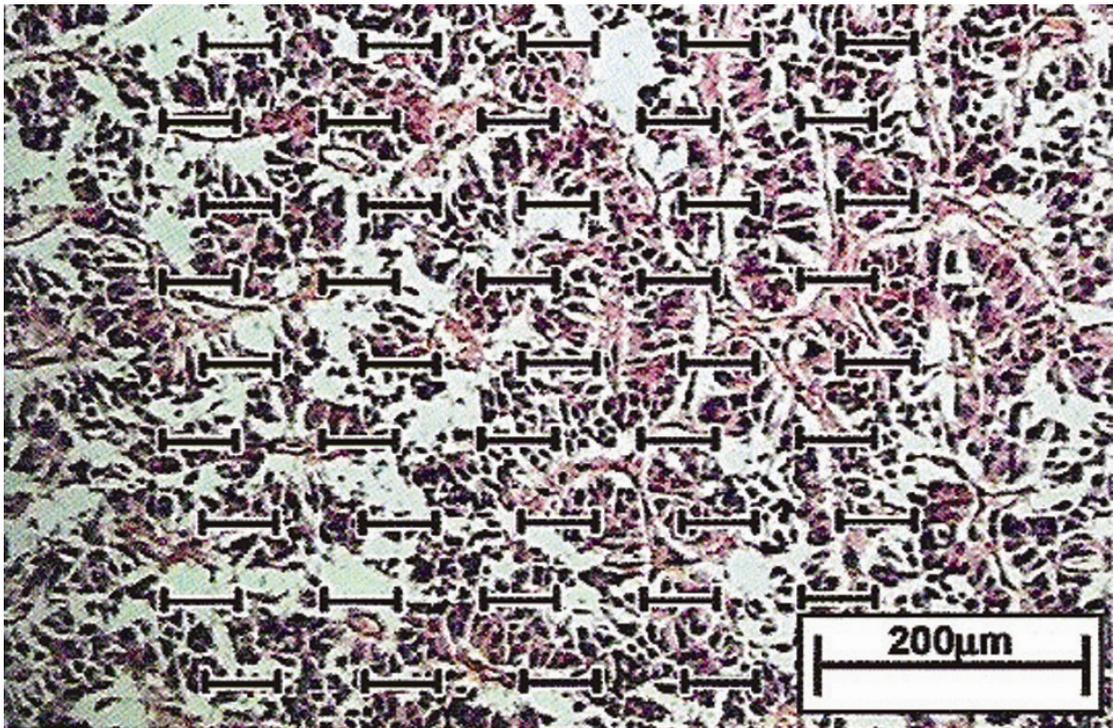


**Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Ki-67 em aumento de 400x. Nota-se coloração castanha nos núcleos das células neoplásicas (Caso nº 9).**



**Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para p53 em aumento de 200x. Nota-se coloração castanha nos núcleos das células neoplásicas (Caso nº 9).**

Para determinar os índices proliferativos depois da imunohistoquímica, foi usada a técnica do *point-counting*, com auxílio de retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas, segundo proposto em 1988 por Gundersen e colaboradores<sup>140</sup>. Ao aumento de 400x, foram examinados 10 campos microscópicos não-coincidentes em cada caso para quantificar todos os pontos que recaem sobre as porções coradas, segundo demonstra a Figura 5. Esse procedimento totaliza 1000 pontos estudados em uma área de  $62.500 \mu\text{m}^2$ , representando a proporção de células coradas positivamente em área de tecido tumoral.



**Figura 5 – Fotomicrografia de lâmina de tumor carcinóide típico corado por HE em aumento de 200x, demonstrando a aplicação do retículo na quantificação da expressão da imunohistoquímica encontrada.**

Os índices de proliferação imunohistoquímicos (IPI) foram obtidos pela seguinte relação:

$$IPI = \frac{P_{ih}}{P_t} \rightarrow [\% \text{ da seção}]$$

Na qual,  $P_{ih}$  e  $P_t$  são os números de pontos que se localizam sobre tecido corado e células tumorais, respectivamente, expressos em porcentagem.

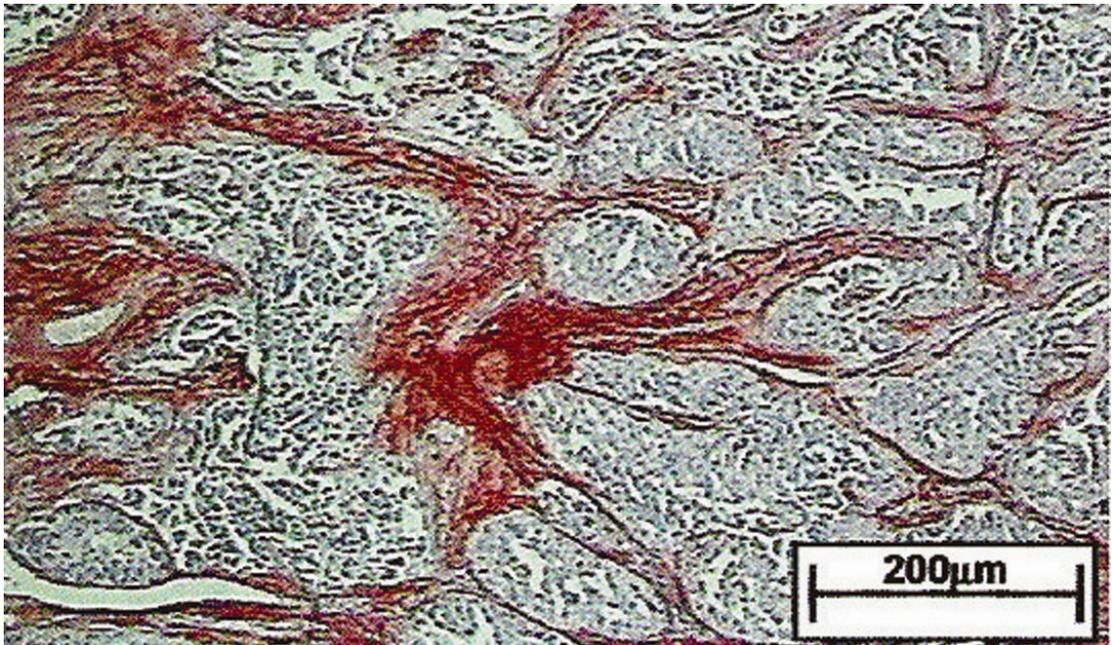
Para todos os procedimentos morfométricos, a estimativa de erro (CE) foi calculada pela relação:

$$CE = \frac{SE}{meam}$$

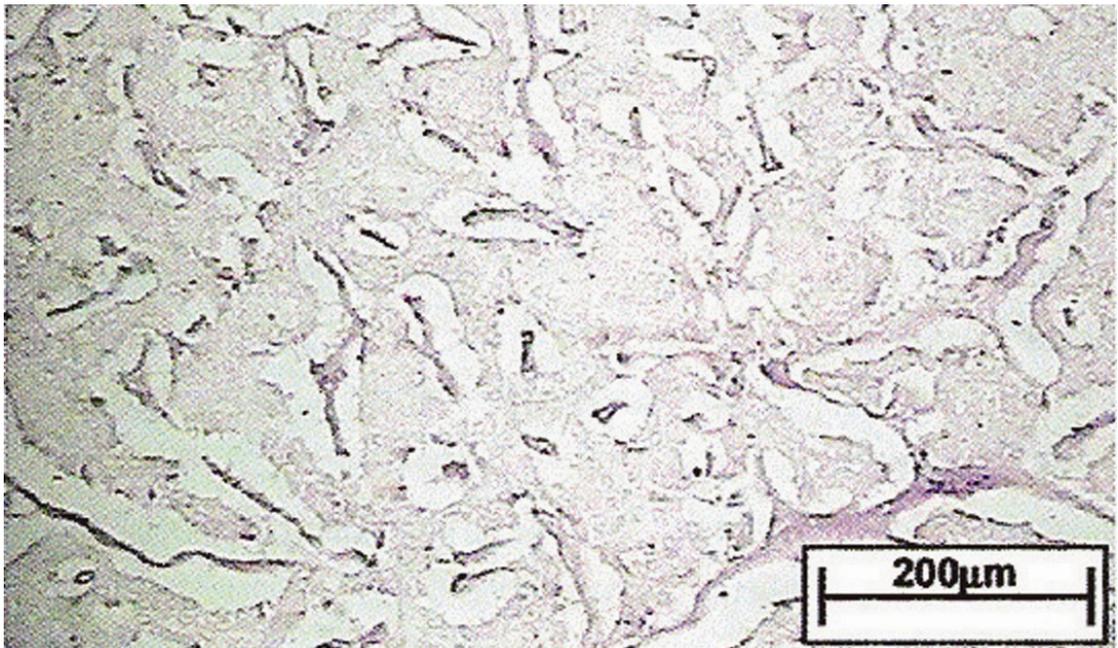
Na qual, SE representa o erro padrão em média. Considerando o número de pontos contados, o CE é mantido abaixo de 10%.

#### 4.2.3.2 QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS ELÁSTICAS E COLÁGENAS

Dez campos representativos (“hot spots”) foram analisados em cada lâmina para cada coloração. A densidade de cada um dos tipos de fibras consideradas na superfície do parênquima tumoral foi determinada pela densidade óptica em um sistema de análise de imagens, conforme observado nas Figuras 6 e 7.



**Figura 6 – Fotomicrografia de lâmina corada para fibras colágenas em aumento de 200x. Nota-se a coloração avermelhada na presença de fibras marcadas (Caso nº 9).**



**Figura 7 – Fotomicrografia de lâmina corada para fibras elásticas em aumento de 100x. Nota-se a coloração violácea na presença de fibras marcadas, permeando as células neoplásicas (Caso nº 9).**

O sistema usado consiste em uma câmara digital CCD Sony DXC-10 aplicada em um microscópio Zeiss Axioplan, sendo que as imagens formadas por este conjunto foram enviadas para um monitor (Trinitron Sony). Por meio de um sistema digitalizador (Oculus TCX, Coreco Inc; Quebec, Canada), as imagens foram capturadas por computador (Pentium 133Mhz), que, deste ponto em diante, foram processadas pelo programa Bioscan-Optimas 5.1 (Bioscan Inc; Washington, USA). O foco do sistema foi ajustado da mesma forma para cada campo, acentuando-se a seguir o contraste para tornar as fibras facilmente identificáveis em preto (fibras elásticas) ou bandas birrefringentes (fibras colágenas). A área ocupada pelas fibras foi determinada por densitometria digital, ajustada à densidade expressa pela tonalidade cinza das fibras. As fibras birrefringentes foram analisadas com o uso de lentes para luz polarizada acopladas ao microscópio.

#### **4.2.4 ORGANIZAÇÃO DOS DADOS**

Os dados obtidos com a quantificação de todos os marcadores estudados encontram-se dispostos na Tabela B1 – Anexo B. Esta, juntamente com a já mencionada Tabela A1 – Anexo A, tornou possível a realização da análise estatística e determinação dos resultados.

As variáveis clínicas e histopatológicas consideradas foram as seguintes: gênero, idade no momento do ato operatório, tipo de ressecção, e também sua localização em relação à carina (central ou periférico), comprometimento da margem cirúrgica, dimensões do tumor (maior diâmetro), estadiamento e TNM segundo a UICC<sup>139</sup>, ocorrência de metástases linfonodais, bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia em relação ao total dissecado, e/ou à distância (local do acometimento e tempo de seguimento livre de doença) e sobrevivência ou ocorrência de óbito. Foram consideradas variáveis biológicas: CD-34, Bcl-2, Ki-67, p53, fibras elásticas e colágenas e densidade estromal. Valores individuais, bem como médias e medidas de dispersão, foram analisados para cada variável e colocadas sob forma de tabelas.

#### **4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A escolha das medidas de tendência central e dispersão dos valores que compõem as amostras, assim como dos testes estatísticos para comparação entre as mesmas baseou-se nos tipos de distribuição. As

distribuições foram consideradas paramétricas. Para todas as análises utilizou-se o programa SPSS versão 10.0 (SPSS Inc; Illinois, USA).

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para as categorizadas utilizaram-se freqüências absolutas e relativas<sup>141</sup>.

Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais utilizou-se o teste “t” de Student, e entre as médias de três ou mais populações foi feita pela análise de variância (ANOVA), com aplicação do teste auxiliar de Bonferroni<sup>142, 143</sup>.

Comparações da freqüência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas pela aplicação do teste exato de Fisher<sup>141</sup>.

Para a verificação de existência de correlação entre duas variáveis, utilizou-se o estudo da correlação de Pearson<sup>142, 143</sup>.

Utilizou-se análise multivariada por regressão logística, em degraus, para a exploração de correlação entre múltiplas variáveis tendo como evento binário estudado a ocorrência de metástase<sup>144</sup>. O coeficiente beta ( $\beta$ ) representa a magnitude da correlação.

As variáveis contínuas, quando agrupadas de forma categorizada, foram definidas pela classificação acima ou abaixo da média. A razão de chances (*odds ratio*) foi utilizada para a ponderação do risco inerente a cada variável categorizada, para a confecção do índice de risco da ocorrência de metástase<sup>137</sup>.

A análise da sobrevivência foi realizada pela curva de Kaplan-Meier.

Para que se considere a diferença entre médias, freqüências ou a presença de correlação entre variáveis, utilizou-se o valor de significância estatística menor ou igual a 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.2.6 ÍNDICE DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE METÁSTASE**

##### **4.2.6.1 ÍNDICE DE RISCO COM BASE NA ANÁLISE MULTIVARIADA**

Para a verificação da possibilidade de se estabelecer um índice numérico de risco para a ocorrência de metástase em pacientes com tumor carcinóide típico, utilizou-se a análise multivariada por regressão logística. O evento binário metástase x não metástase foi definido como fenômeno a ser estudado.

Somente os fatores clínicos e os biomarcadores que apresentaram correlação com o fenômeno metastático à análise univariada foram incluídos na equação de regressão logística para análise multivariada em degraus.

A equação define o coeficiente de risco ( $\beta$ ) para a ocorrência de metástase para cada variável independente. Também define o valor da constante, que deve ser somada à equação final. O valor da constante representa o risco de metástase para um indivíduo hipotético que não apresente nenhum fator de risco.

A equação geral do risco para um indivíduo será representada pela soma do valor do risco específico determinado para cada variável independente, acrescida do valor da constante.

O risco específico determinado por uma única variável é dado pelo produto: valor medido para a variável  $x$   $[1/(1+e^{-z})]$ . O valor de "z" é dado pela análise multivariada de regressão logística, e representa um coeficiente de risco designado pela letra  $\beta$ , e "e" é a constante de Neper.

A equação final de risco para um dado paciente será: Risco =  $C + \sum$  valor medido para cada variável  $x$   $[1/(1+e^{-z})]$ .

Dado a pouca praticidade de um índice que exija cálculos que não fazem parte do cotidiano médico, propôs-se um outro método simplificado, que mesmo sem validade externa, seja um modelo hipotético a ser desenvolvido por estudos futuros.

#### **4.2.6.2 PROPOSTA DE UM MODELO SIMPLIFICADO PARA ÍNDICE DE RISCO**

Para a proposição de um índice simplificado, optou-se por um método que utilize a soma de pontos.

As variáveis contínuas foram categorizadas em dois grupos, um que denote maior e outro que denote menor risco. As variáveis utilizadas para o índice foram aquelas que estatística e biologicamente têm correlação com o risco de metástase, à análise univariada.

Para a transformação de variáveis contínuas em categorizadas, utilizou-se arbitrariamente a média dos valores, dividindo os pacientes em dois grupos: acima e abaixo da média, para cada marcador.

Os pontos a serem somados para cada variável também foram definidos de forma binária: zero para o grupo de menor risco e o valor da razão de chances para o grupo de maior risco.

O índice será zero para o indivíduo que não apresente nenhuma variável clínica ou biomarcador que indique maior risco. O valor máximo do índice será a soma de cada valor da razão de chances (*odds ratio*) para as variáveis incluídas. Um paciente terá o maior índice quando apresentar todos os fatores envolvidos com maior risco.

Após o estabelecimento do valor máximo e mínimo, classificou-se todos os pacientes em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto. Para tal, utilizou-se a divisão dos 55 doentes em quartis, segundo o valor dos índices obtidos para a população. O primeiro quartil foi representado pelos pacientes com os menores valores para o índice, o quarto quartil, aqueles com os maiores.

No caso da ocorrência de mesmo valor de índice para vários indivíduos, definiu-se o valor de corte entre dois quartis contíguos, aquele de mantivesse a divisão dos grupos iniciais o mais próxima do agrupamento inicial.

Propõe-se um modelo que permita, com a progressão das pesquisas de novos marcadores, e com o aumento do número de pacientes seguidos, a fácil agregação de novas variáveis, e a substituição do valor da razão de chances.

## **5. RESULTADOS**

## **5. RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados por etapas: descrição e análise da casuística; análise da expressão dos marcadores e dados relativos ao índice de risco de ocorrência de metástase proposto.

### **5.1 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA**

Os dados clínicos e histopatológicos de todos os 55 pacientes incluídos no estudo são apresentados na Tabela A1 – Anexo A.

#### **5.1.1 GÊNERO**

A distribuição de acordo com o gênero foi de 41,8% (23/55) para o gênero masculino e de 58,2% (32/55) para o feminino, na proporção aproximada de 2:3, respectivamente.

#### **5.1.2 IDADE**

A média de idade foi de 39,8 anos (mínima de 9 anos e máxima de 77 anos) com desvio-padrão de 15,8 anos e mediana de 38 anos.

### **5.1.3 TIPO DE RESSECÇÃO EMPREGADA**

A ressecção cirúrgica foi o tratamento realizado em todos os pacientes do estudo. As operações não foram realizadas pelo mesmo cirurgião, mas o foram pelos componentes de uma mesma equipe, em um único hospital. A descrição dos procedimentos será realizada em três partes: via de acesso, estrutura (s) ressecada (s) e dissecação linfonodal.

#### **5.1.3.1 VIA DE ACESSO**

Não houve ressecção por via endoscópica e nem por técnica videoassistida. Em todos os casos a operação foi realizada por toracotomia. A toracotomia anterior foi a via de acesso em 7 casos: 1 ressecção em cunha para a retirada de um nódulo periférico de 3 cm em lobo superior esquerdo e 6 lobectomias superiores (4 à esquerda e 2 à direita). Para 47 pacientes, a operação foi realizada utilizando-se a toracotomia pósterolateral. Em uma paciente operada em 1999, realizou-se a lobectomia inferior esquerda por toracotomia poupadora de músculo (tanto grande dorsal quanto serrátil anterior).

#### **5.1.3.2 ESTRUTURA (s) RESSECADA (s)**

A amplitude da operação variou desde a retirada do tumor pela ressecção em cunha ou em manga, até a pneumonectomia. Os

procedimentos realizados foram: um paciente (1,8%) foi submetido a ressecção em cunha, 34 (61,8%) a lobectomias, quatro (7,3%) a bilobectomias e 11 (20,0%) a pneumonectomias, enquanto que em cinco casos (9,1%) o procedimento empregado foi a ressecção em manga, com reconstrução por broncoplastia.

#### **5.1.3.2.1 DISSECÇÃO LINFONODAL**

A ressecção de linfonodos mediastinais e hilares ipsilaterais ao tumor foi realizada em 83,6% (46/55) dos doentes. A quantidade de linfonodos retirados por paciente variou desde 1 estrutura até 25 (Tabela A1 - Anexo A).

Dos 46 casos de dissecção mediastinal, obteve-se ao todo 298 linfonodos, em média  $6,5 \pm 5,4$  por paciente submetido a este tipo de ressecção. Deste total, 5,7% (17/298) dos linfonodos estavam acometidos por tumor carcinóide típico, sendo que em três indivíduos, 1 linfonodo continha metástase, em quatro pacientes 2 estruturas eram positivas, e em dois doentes 3 linfonodos continham a neoplasia.

Em 16,4% (9/55) dos indivíduos não houve retirada de estruturas linfonodais. À revisão dos prontuários referentes a estes casos, não se encontrou descrição de linfonodomegalias, nem menção quanto à exploração mediastinal.

Devido à heterogeneidade da exploração operatória mediastinal, foram excluídos do estudo todos os indivíduos que não possuíam exame de tomografia computadorizada de tórax realizada 5 anos após o ato cirúrgico

(ver descrição e discussão do seguimento pós-operatório), para a verificação de linfonomegalia mediastinal.

#### 5.1.4 LOBO OU SEGMENTO BRÔNQUICO ACOMETIDO

Os lobos ou segmentos brônquicos acometidos pelo tumor carcinóide típico, bem como a frequência e a porcentagem de ocorrência em cada um deles, encontram-se detalhados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Frequência e porcentagem de lobos ou segmentos brônquicos acometidos por tumor carcinóide típico**

Localização	Frequência	Porcentagem
Brônquio Principal Esquerdo	10	18,2
Lobo Médio	9	16,4
Lobo Inferior Direito	8	14,5
Lobo Superior Direito	8	14,5
Lobo Superior Esquerdo	8	14,5
Lobo Inferior Esquerdo	7	12,8
Brônquio Principal Direito	3	5,5
Brônquio Intermédio	2	3,6
<b>TOTAL</b>	<b>55</b>	<b>100,0</b>

#### 5.1.5 LOCALIZAÇÃO DO TUMOR EM RELAÇÃO À CARINA

Em relação à carina, 85,5% dos tumores (47/55) eram centrais, e 14,5% (8/55) periféricos (distais aos brônquios segmentares).

## 5.1.6 DIMENSÕES DO TUMOR

A avaliação da dimensão do tumor seguiu dois critérios: maior diâmetro e volume do tumor; sendo estes explicitados a seguir.

### 5.1.6.1 MAIOR DIÂMETRO

A média do maior diâmetro dos tumores foi de 29,5 mm (mínimo de 5 mm e máximo de 70 mm) com desvio-padrão de 16,7 mm.

### 5.1.6.2 VOLUME

O volume tumoral médio foi de  $2,1 \times 10^4 \text{ mm}^3$  (mínimo de  $3,3 \times 10 \text{ mm}^3$  e máximo de  $1,8 \times 10^5 \text{ mm}^3$ ), sendo seu desvio padrão de  $3,4 \times 10^4 \text{ mm}^3$ .

Para a mensuração dessa variável, utilizou-se a fórmula de cálculo do volume de um sólido elipsoidal (V)<sup>145</sup>, segundo fórmula abaixo:

$$V = 4\pi/3 \times (a \times b \times c) \rightarrow [mm^3]$$

Na qual, “a”, “b” e “c” são os semi-eixos do tumor, ou seja, metade dos três diâmetros principais, expressos em milímetros.

## 5.1.7 COMPROMETIMENTO DA MARGEM CIRÚRGICA

A margem cirúrgica foi classificada pelo patologista como livre, em 83,6% dos casos (46/55), e como comprometida em 16,4% (9/55).

Os 9 casos de comprometimento da margem por tumor ocorreram em pacientes com lesões centrais. Seis doentes foram tratados com lobectomia (2 em lobo superior esquerdo, 2 em superior direito, 1 em lobo médio e 1 em inferior esquerdo), 2 com ressecção em manga e broncoplastia, e em 1 caso, o tumor era periférico e invadia o brônquio pela face contraluminal.

### **5.1.8 ESTADIAMENTO**

Após revisão do estadiamento operatório final dos 55 casos, a distribuição apresenta 19 pacientes (34,5%) no estadio IA; 20 (36,4%) no IB; um (1,8%) no IIA; oito (14,5%) no IIB; seis (10,9%) no IIIA e um doente (1,8%) no estadio IV, não sendo classificado nenhum indivíduo como IIIB.

#### **5.1.8.1 CARACTERÍSTICAS DO TUMOR PRIMÁRIO (T)**

Quanto ao T, 23 pacientes (41,8%) foram classificados como T1, 22 (40,0%) como T2 e dez (18,2%) como T3, não sendo constatados indivíduos classificados como T4. Não Houve mudança do estadiamento devido a alterações do T.

### 5.1.8.2 METÁSTASE LINFONODAL (N)

Para a determinação do status linfonodal em cada paciente, definiu-se como critério de inclusão no estudo, o seguimento pós-operatório mínimo de 5 anos e o estudo tomográfico mediastinal após o período.

Definiu-se como estadiamento linfonodal N0 os pacientes que preencheram dois requisitos: não terem linfonodos acometidos por metástase ao momento operatório, nem imagens compatíveis com linfonodos com mais de 1 cm de maior diâmetro à tomografia computadorizada de tórax realizada após o 5º ano de seguimento.

Os doentes que não tiveram linfonodos ressecados e que não apresentaram imagens tomográficas compatível com linfonodos com maior diâmetro acima de 1 cm após 5 anos de seguimento, foram considerados como no estadio N0.

Dos 55 pacientes, 9 (16,3%) não tiveram linfonodos ressecados à operação. Um deles evoluiu a óbito no terceiro mês, por metástase hepática, sendo submetido ao exame de necrópsia. A busca ativa de metástases hematogênicas e linfonodais não demonstrou linfonodos comprometidos. Os outros 8 pacientes foram acompanhados por mais de 5 anos, aliás, todos os 8 tiveram seguimento maior que 10 anos.

Em 83,6% (46/55) dos pacientes realizou-se a exploração cirúrgica do hilo pulmonar e do mediastino. Destes, 19,6% (9/46) tiveram linfonodos acometidos por tumor carcinóide. Um paciente apresentou estadiamento N1

e oito, N2. Não foi constatado nenhum paciente com estadio N3. Ver item: "Tipo de ressecção empregada".

Todos os 298 linfonodos ressecados foram revistos à coloração pela HE, para verificação do diagnóstico. Houve concordância entre os dois patologistas do estudo, que havia metástase para os linfonodos descritos anteriormente como acometidos.

### **5.1.8.3 METÁSTASE À DISTÂNCIA (M)**

Considerou-se metástase à distância a comprovação de tecido de tumor carcinóide típico em localização que não a da lesão primária.

Utilizou-se como critério de exclusão a presença de Síndrome de Neoplasia Endócrina Múltipla ou a presença de tumor carcinóide intestinal com lesão única pulmonar de igual padrão histológico.

Considerou-se o paciente livre de metástase à distância, aquele que não apresentou imagem sugestiva do acometimento em campos pulmonares, fígado ou glândulas supra-renais à tomografia computadorizada, nem sinais ou sintomas suspeitos. Sinais ou sintomas suspeitos foram: cefaléia, dor retro-ocular, alterações neurológicas, dores ósseas, nódulos cutâneos ou subcutâneos.

Todos os 55 pacientes inclusos no estudo tinham exames de imagem que abrangiam as regiões anatômicas do tórax e abdômen superior.

Metástase à distância foi detectada em 10,9% (6/55) dos indivíduos, e ausente em 89,1% (49/55) dos casos. Cada paciente apresentou metástase

para um órgão único, não houve caso de dois sítios acometidos no mesmo indivíduo.

Os sítios de destino das metástases hematogênicas foram: fígado em 2 casos, clavícula direita em 1 caso, glândula tireóide em 1 paciente, outro lobo pulmonar em 1 caso e gordura mediastinal em 1 indivíduo.

Os casos de metástase hepática tinham imagem tomográfica sugestiva, ambos confirmados histologicamente, um à biópsia e outro à necrópsia. O caso de lesão em clavícula foi diagnosticado devido a investigação de dor óssea persistente e localizada.

A paciente com metástase para a glândula tireóide teve seu diagnóstico feito incidentalmente à tomografia computadorizada de tórax. Aventou-se a hipótese de adenoma de glândula paratireóide e quadro de Neoplasia Endócrina Múltipla, foi encaminhada ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço sem suspeita de metástase. O exame com radiomarcador MIBI mostrou captação. A ressecção cirúrgica do tumor sob suspeita de adenoma de paratireóide resultou no diagnóstico de tumor carcinóide típico. O padrão histológico descartou carcinoma neuroendócrino medular da tireóide. Apesar do diagnóstico ter sido feito após 5 anos de acompanhamento, a paciente não realizou exame tomográfico nos 2 anos anteriores, não se sabendo portanto qual foi o período aproximado do acometimento da glândula.

Os pacientes com lesão em gordura mediastinal e lobo pulmonar diverso do tumor primário tiveram o diagnóstico como resultado de exames de tomografia. Ambos eram assintomáticos. No caso do doente com lesão

em gordura mediastinal, o diagnóstico foi feito após 5 anos de acompanhamento.

Um paciente que apresentava Neoplasia Endócrina Múltipla foi excluído do estudo. Não houve casos de neoplasia gastrointestinal concomitante.

#### **5.1.8.4 PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE LINFONODAL E/OU HEMATOGENICA**

Para a realização de comparações, optou-se por agrupar os indivíduos em dois grupos: (1) aqueles nos quais não havia a presença de metástases, o que representa 76,4% (42/55) da amostra; (2) aqueles nos quais foi observada a presença de metástase linfática e/ou hematogênica, que representou 23,6% (13/55) da população em estudo. Em dois indivíduos, havia a presença de metástases linfonodais e à distância concomitantemente.

#### **5.1.9 SEGUIMENTO**

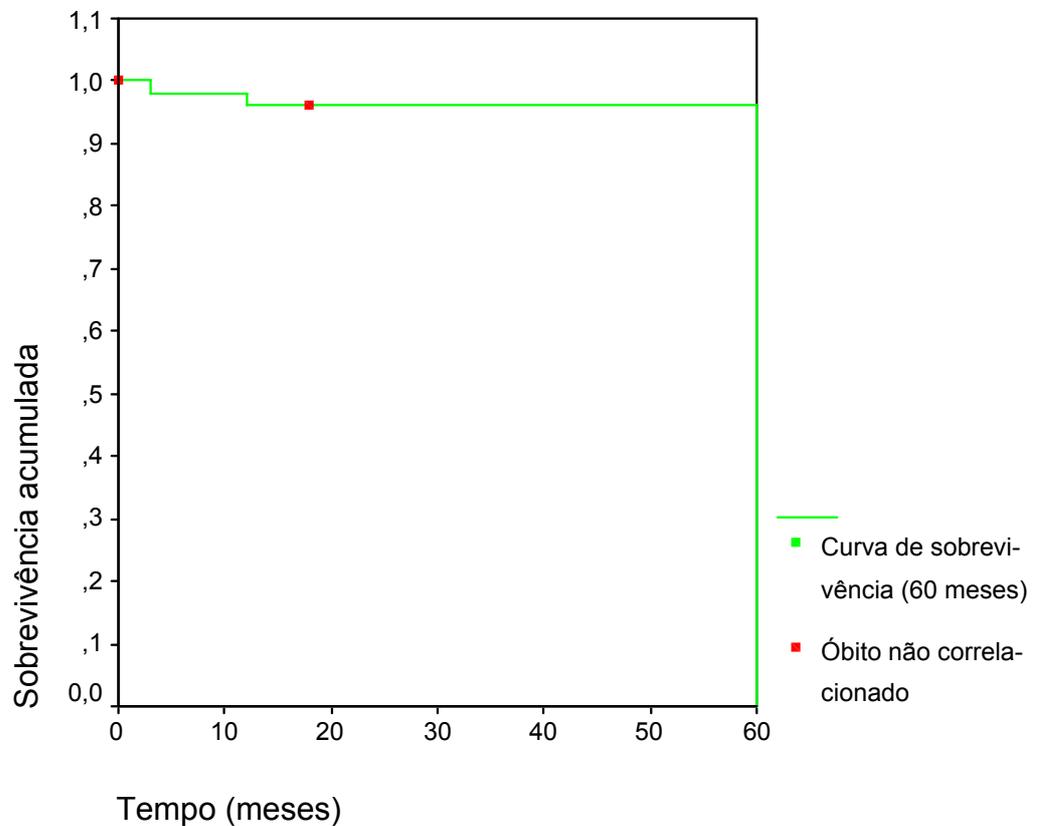
O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de  $140,1 \pm 64,1$  meses (mínimo de 0 mês e máximo de 270 meses).

O seguimento por 60 meses ou mais foi obtido para 53 doentes. Os 2 casos que não foram acompanhados por esse período apresentaram morte não correlacionada: 1 no segundo dia pós-operatório, por sepse, e outro no 18º mês por infarto agudo do miocárdio.

### 5.1.9.1 TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL

A taxa de sobrevivência global em 5 anos foi de 96,3%. A curva de Kaplan-Meier para sobrevivência em 5 anos está representada na Figura 8.

Os 2 casos de óbito correlacionado ao tumor carcinóide foram decorrentes de metástase hepática em 3 e 12 meses.

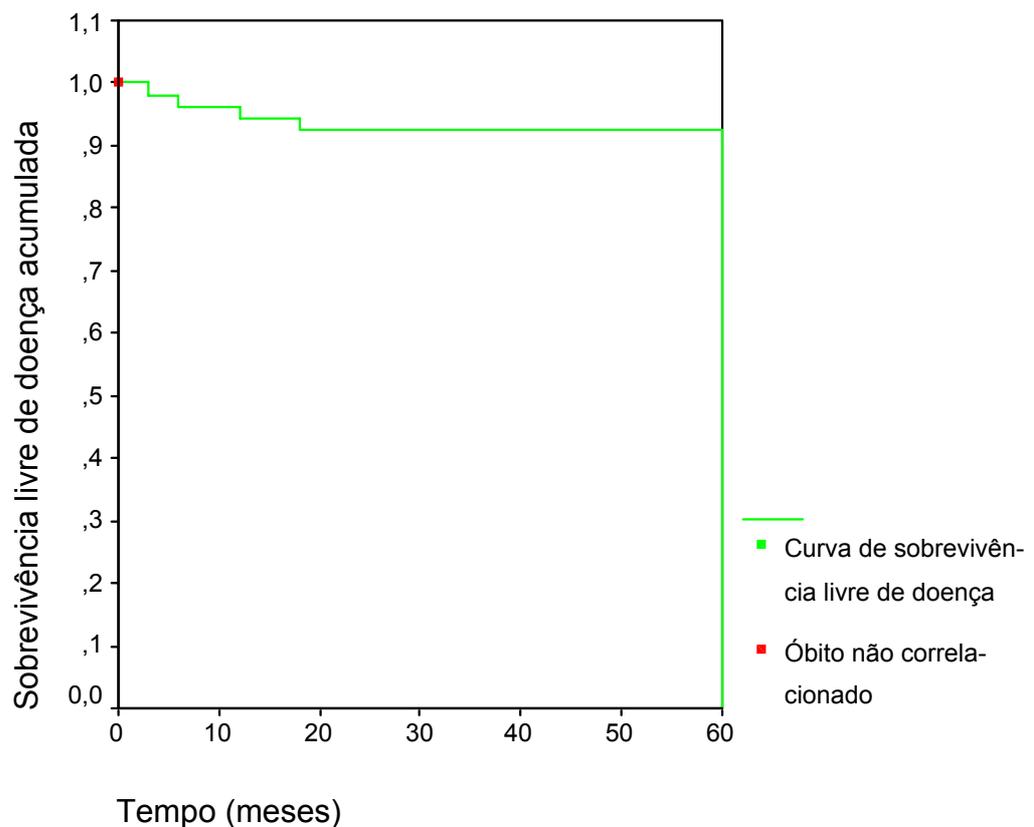


**Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência em 60 meses.**

### 5.1.9.2 TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA

O tempo médio de sobrevivência livre de doença de toda casuística foi de  $135,9 \pm 62,5$  meses (mínimo de 3 meses e máximo de 169 meses). Em seis doentes houve metástase à distância, sendo que, para estes, o tempo médio de sobrevivência livre de doença foi de  $32,5 \pm 35,8$  meses (mínimo de 3 meses e máximo de 84 meses).

A taxa de sobrevivência livre de doença em 5 anos foi de 92,6%. Ao considerar o seguimento total, a taxa foi de 88,4%. A curva de Kaplan-Meier para a sobrevivência livre de doença está representada na Figura 9.



**Figura 9 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença em 60 meses.**

## **5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE DOS DADOS DA CASUÍSTICA X METÁSTASE**

### **5.2.1 GÊNERO X METÁSTASE**

A ocorrência de metástase foi de 39% (9/23) entre os homens e de 12,5% (4/32) entre as mulheres (Teste Exato de Fisher,  $p=0,025$ ).

### **5.2.2 IDADE X METÁSTASE**

No grupo de doentes com idade inferior a 40 anos, a ocorrência de metástase foi de 13,8% (4/29) e entre aqueles com 40 anos ou mais, foi de 34,6% (9/26) (Teste Exato de Fisher,  $p=0,067$ ).

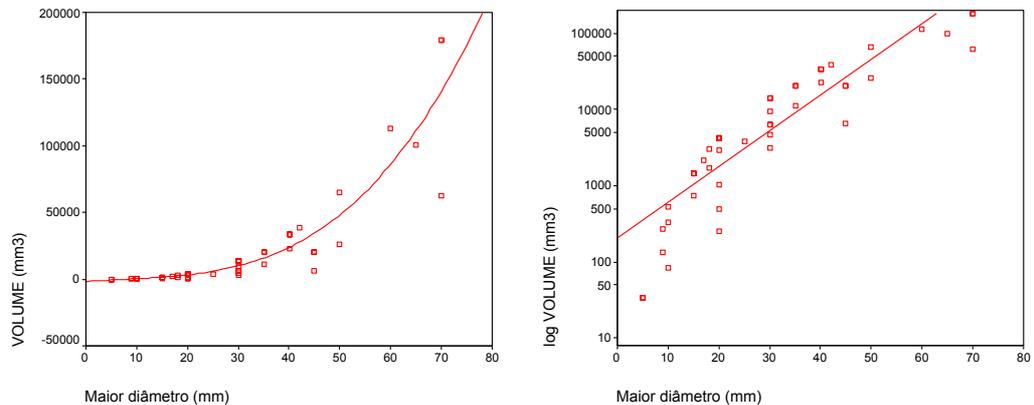
### **5.2.3 CENTRAL E PERIFÉRICO X METÁSTASE**

No grupo de doentes com tumores centrais, a ocorrência de metástase foi de 23,4% (11/47) e entre aqueles com tumores periféricos foi de 25,0% (2/8) (Teste Exato de Fisher,  $p=0,615$ ).

### **5.2.4 DIMENSÕES DO TUMOR X METÁSTASE**

Para o estudo das dimensões tumorais, utilizou-se o maior diâmetro em milímetros. O volume, em milímetros cúbicos, apresenta correlação com

essa variável (Coeficiente de Correlação de Pearson,  $r=0,819$ ,  $p\leq 0,0001$ ), conforme demonstrado na Figura 10.



**Figura 10 – Gráficos da correlação entre maior diâmetro e volume dos tumores.**

#### 5.2.4.1 MAIOR DIÂMETRO TUMORAL X METÁSTASE

Os tumores que não geraram metástase possuíam maior diâmetro médio de  $28,8 \pm 15,7$  mm e os que as geraram,  $31,9 \pm 20,1$  mm (Teste “t” de Student,  $p=0,555$ ).

#### 5.2.4.2 VOLUME TUMORAL X METÁSTASE

Os tumores que não geraram metástase possuíam volume médio de  $2,0 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^4$  mm<sup>3</sup> e os que as geraram,  $2,3 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^4$  mm<sup>3</sup> (Teste “t” de Student,  $p=0,593$ ).

### 5.2.5 MARGEM CIRÚRGICA COMPROMETIDA POR TUMOR X METÁSTASE À DISTÂNCIA

No grupo de doentes cuja análise microscópica da margem de ressecção demonstrou presença de células tumorais, a ocorrência de metástase à distância foi de 33,3% (3/9) e entre aqueles com margem livre, foi de 6,5% (3/46) (Teste Exato de Fisher,  $p=0,049$ ).

### 5.2.6 TNM X METÁSTASE À DISTÂNCIA

A ocorrência de metástase à distância para cada grupo do estadiamento TNM está disposta na tabela 3.

**Tabela 3 – Ocorrência de metástase à distância por grupos de estadiamento TNM da UICC**

Estadio	Metástase à distância		Total
	Sem Metástase	Com Metástase	
IA (%)	17 (89,5)	2 (10,5)	19 (100)
IB (%)	18 (90,0)	2 (10,0)	20 (100)
IIA (%)	1 (100,0)	0	1 (100)
IIB (%)	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100)
IIIA (%)	6 (100)	0	6 (100)
IIIB (%)	0	0	0 (100)
IV (%)	0	1 (100)	1 (100)
<b>Total (%)</b>	<b>49 (89,0)</b>	<b>6 (11,0)</b>	<b>55 (100)</b>

Teste do Qui-quadrado de Pearson,  $p=0,107$ .

### **5.3 RESULTADOS RELATIVOS AOS ÍNDICES DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES TUMORAIS**

#### **5.3.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DOS MARCADORES**

Os valores obtidos pela quantificação da expressão imunohistoquímica e pela quantificação de fibras estromais, para cada indivíduo, são mostrados na Tabela B1 – Anexo B. Os valores de média, desvio-padrão, mínimo, máximo e casos sem marcação são mostrados na Tabela C1 – Anexo C.

##### **5.3.1.1 Ki-67**

Os valores obtidos pela quantificação da expressão imunohistoquímica da proteína nuclear Ki-67 são: média de 2,3, com desvio-padrão de 2,4, valor mínimo de 0 e máximo de 7,7. Não houve detecção imunohistoquímica do Ki-67 em 17 (30,9%) casos.

##### **5.3.1.2 p53**

Os valores obtidos pela quantificação da expressão imunohistoquímica da proteína nuclear p53 foram: média de 2,2, com desvio-padrão de 2,3, mínimo de 0 e máximo de 7,2. Não se detectou marcação em 17 casos (30,9%).

### **5.3.1.3 Bcl-2**

Os valores obtidos pela quantificação da expressão imunohistoquímica da proteína citoplasmática Bcl-2 foram: média de 8,9, com desvio-padrão de 4,9, mínimo de 0 e máximo de 19. Não se detectou marcação em 5 casos (9,1%).

### **5.3.1.4 CD-34**

Os valores obtidos pela quantificação do número de microvasos por  $\mu\text{m}^2$  marcados pelo foram: média de 8,4, com desvio-padrão de 5,5, mínimo de 2,3 e máximo de 21,9. Em todos os casos houve marcação.

### **5.3.1.5 FIBRAS COLÁGENAS**

Os valores obtidos pela quantificação das fibras colágenas foram: média de 11,1 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , com desvio-padrão de 6,6 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , mínimo de 0,06 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , e máximo de 27,5 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ . Em todos os casos houve marcação.

### **5.3.1.6 FIBRAS ELÁSTICAS**

Os valores obtidos pela quantificação das fibras elásticas foram: média de 13,3 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , com desvio-padrão de 4,9 unidades

ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , mínimo de 3,0 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , e máximo de 19,50unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ . Em todos os casos houve marcação.

#### **5.3.1.7 DENSIDADE ESTROMAL**

Os valores obtidos pela quantificação da densidade estromal foram: média de 24,9 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , com desvio-padrão de 10,3 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , mínimo de 3,5 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ , e máximo de 41,1 unidades ópticas/ $\mu\text{m}^2$ . Em todos os casos houve marcação.

#### **5.3.2 MARCADORES X MARCADORES**

As correlações dos índices de expressão imunohistoquímica dos marcadores entre si estão dispostas na Tabela D1 – Anexo D.

#### **5.3.3 MARCADORES X DIMENSÕES TUMORAIS**

Não houve correlação entre a dimensão do tumor e o índice de expressão imunohistoquímica para nenhum dos marcadores (Coeficientes de Correlação de Pearson não significantes).

### 5.3.4 MARCADORES X METÁSTASE

As comparações das médias dos índices de expressão de cada marcador, entre os grupos de doentes com e sem metástase estão representadas nas Tabelas 4, 5 e 6, a seguir.

#### 5.3.4.1 METÁSTASE LINFONODAL

Considerou-se ausência de metástase linfonodal a observação de: registro tomográfico sem imagem compatível com linfonodos com diâmetro maior que 1,0 cm após 5 anos de seguimento e ausência de comprometimento metastático dos linfonodos mediastinais e hilares ressecados ao ato operatório.

**Tabela 4 – Comparação das médias do índice de expressão de cada marcador entre os grupos de indivíduos com e sem metástase linfonodal**

Marcador	Metástase linfonodal		p*
	Sem Metástase**	Com Metástase**	
<b>Ki-67</b>	1,9 ± 2,1	4,2 ± 3,0	0,007
<b>p53</b>	1,9 ± 2,1	3,9 ± 2,7	0,015
<b>Bcl-2</b>	9,7 ± 4,6	5,0 ± 4,4	0,007
<b>CD-34</b>	6,9 ± 4,0	16,1 ± 5,9	0,000
<b>Fibras colágenas</b>	12,1 ± 6,3	5,8 ± 5,9	0,007
<b>Fibras elásticas</b>	14,3 ± 4,1	8,4 ± 5,9	0,001
<b>Densidade estromal</b>	26,9 ± 8,8	14,8 ± 12,1	0,001

\* Teste “t” de Student. \*\* média±1 desvio-padrão (n = 55).

### 5.3.4.2 METÁSTASE À DISTÂNCIA

**Tabela 5 – Comparação das médias do índice de expressão de cada marcador entre os grupos de indivíduos com e sem metástase à distância**

Marcador	Metástase à distância		p*
	Sem Metástase**	Com Metástase**	
<b>Ki-67</b>	2,3 ± 2,3	2,3 ± 3,2	0,966
<b>p53</b>	2,2 ± 2,3	2,6 ± 2,3	0,657
<b>Bcl-2</b>	9,0 ± 4,7	8,1 ± 6,5	0,672
<b>CD-34</b>	8,5 ± 5,6	6,9 ± 4,5	0,496
<b>Fibras colágenas</b>	11,6 ± 6,6	7,2 ± 5,0	0,125
<b>Fibras elásticas</b>	13,5 ± 5,1	12,3 ± 3,4	0,576
<b>Densidade estromal</b>	25,3 ± 10,6	21,6 ± 7,2	0,416

\* Teste “t” de Student. \*\* média±1 desvio-padrão.

### 5.3.4.3 METÁSTASE LINFONODAL OU À DISTÂNCIA

**Tabela 6 – Comparação das médias do índice de expressão de cada marcador entre os grupos de indivíduos com e sem metástase linfonodal ou à distância.**

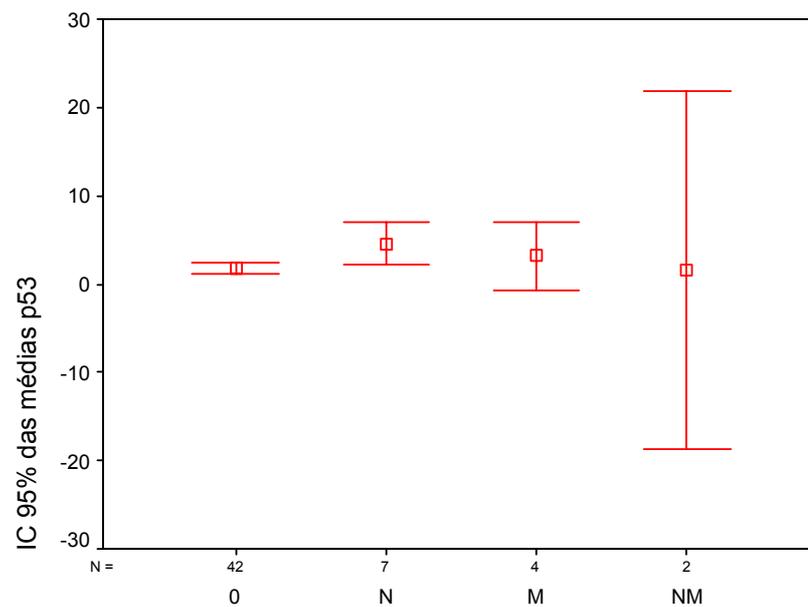
Marcador	Metástase linfonodal ou à distância		p*
	Sem Metástase**	Com Metástase**	
<b>Ki-67</b>	1,8 ± 1,9	3,9 ± 3,1	0,005
<b>p53</b>	1,8 ± 2,0	3,7 ± 2,6	0,008
<b>Bcl-2</b>	9,7 ± 4,4	6,5 ± 5,7	0,036
<b>CD-34</b>	6,8 ± 3,9	13,4 ± 7,0	0,000
<b>Fibras colágenas</b>	12,7 ± 6,0	6,0 ± 5,7	0,001
<b>Fibras elásticas</b>	14,6 ± 4,0	9,2 ± 5,4	0,000
<b>Densidade estromal</b>	27,6 ± 8,7	16,2 ± 10,8	0,000

\* Teste t de Student. \*\* média±1 desvio-padrão.

#### **5.3.4.4 MÉDIA DOS VALORES DE EXPRESSÃO DE CADA MARCADOR X GRUPOS DE METÁSTASE**

Para cada marcador (p53, Ki-67, densidade de microvasos, fibras colágenas, elásticas e densidade estromal), foi elaborado um gráfico que mostra a média dos valores do índice de expressão imunohistoquímica ou densidade de fibras, representados nas Figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16 respectivamente. As médias de quatro grupos de pacientes são comparadas em cada gráfico: indivíduos sem qualquer metástase (0), com metástase linfonodal (N), com metástase à distância (M) e com metástases linfonodal e à distância concomitantes (NM).

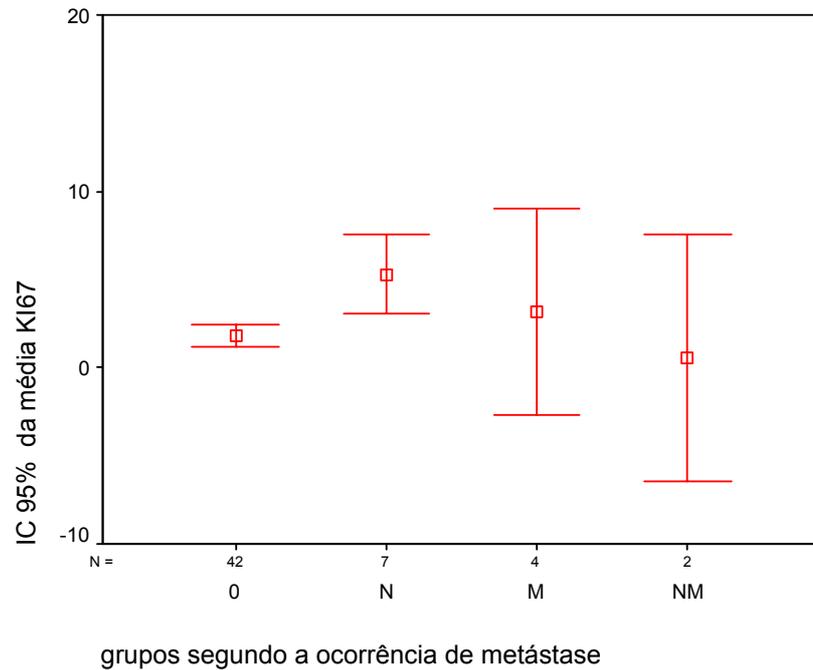
As linhas verticais representam o erro-padrão da média, aceitando-se o intervalo de confiança de 95%. A comparação das médias entre os quatro grupos de pacientes, para cada marcador, foi realizada por análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste auxiliar de Bonferroni.



Grupos segundo a ocorrência de metástase

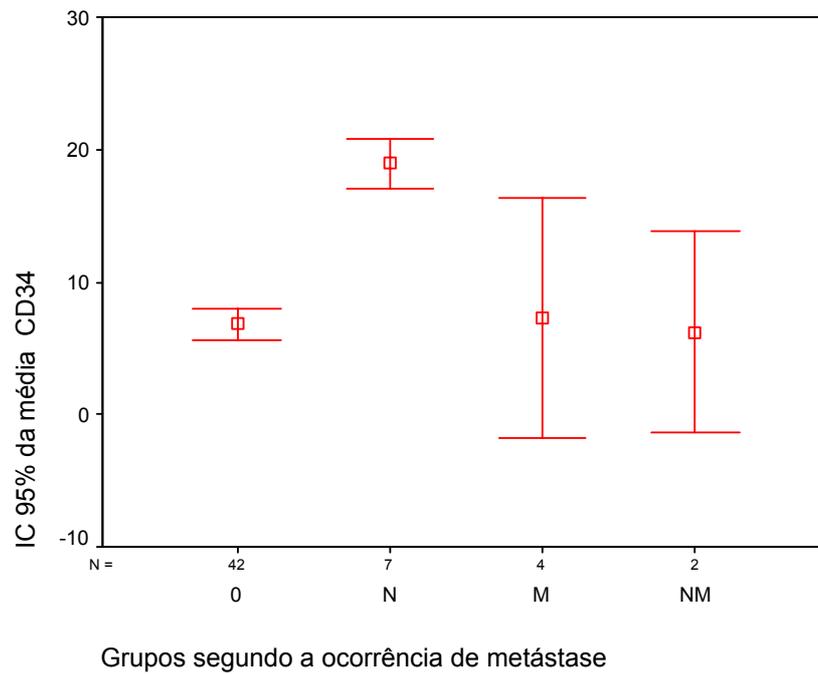
**Figura 11 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de p53 entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).**

LEGENDA: 0 = ausência de metástase; N = metástase linfonodal; M = metástase à distância; NM = metástase linfonodal e à distância. (ANOVA,  $p=0,018$ ).



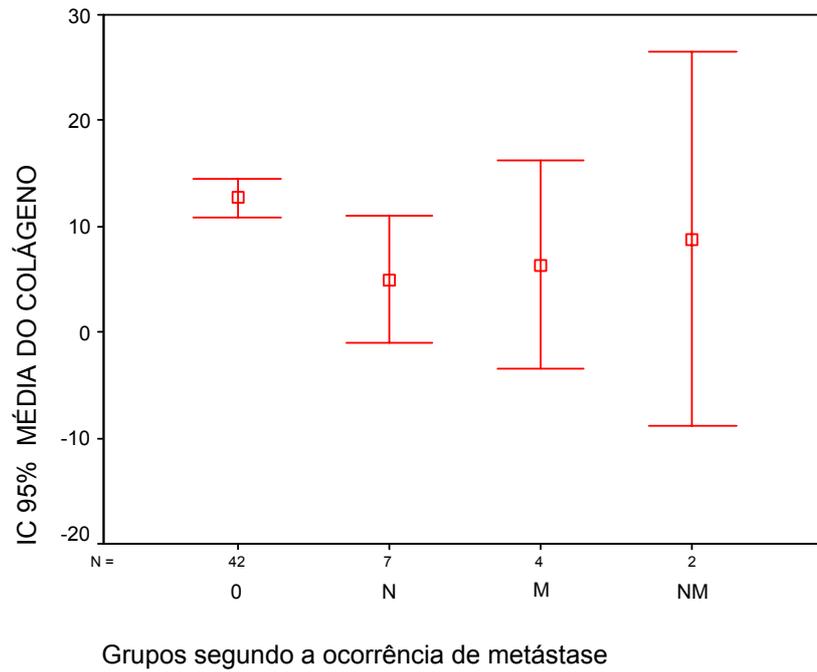
**Figura 12 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de Ki-67 entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).**

LEGENDA: 0 = ausência de metástase; N = metástase linfonodal; M = metástase à distância; NM = metástase linfonodal e à distância. (ANOVA,  $p=0,001$ ).



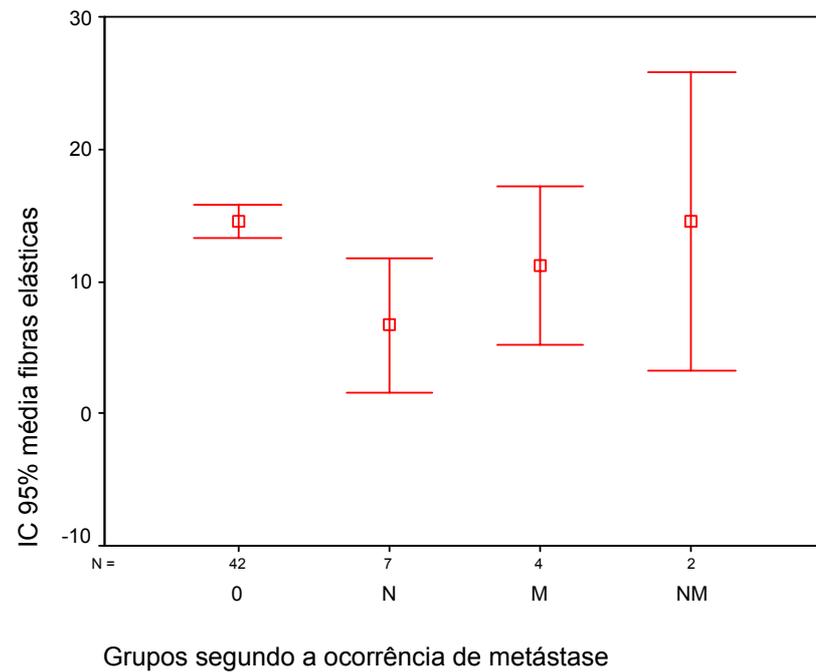
**Figura 13 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de CD-34 entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).**

LEGENDA: 0 = ausência de metástase; N = metástase linfonodal; M = metástase à distância; NM = metástase linfonodal e à distância. (ANOVA,  $p=0,001$ ).



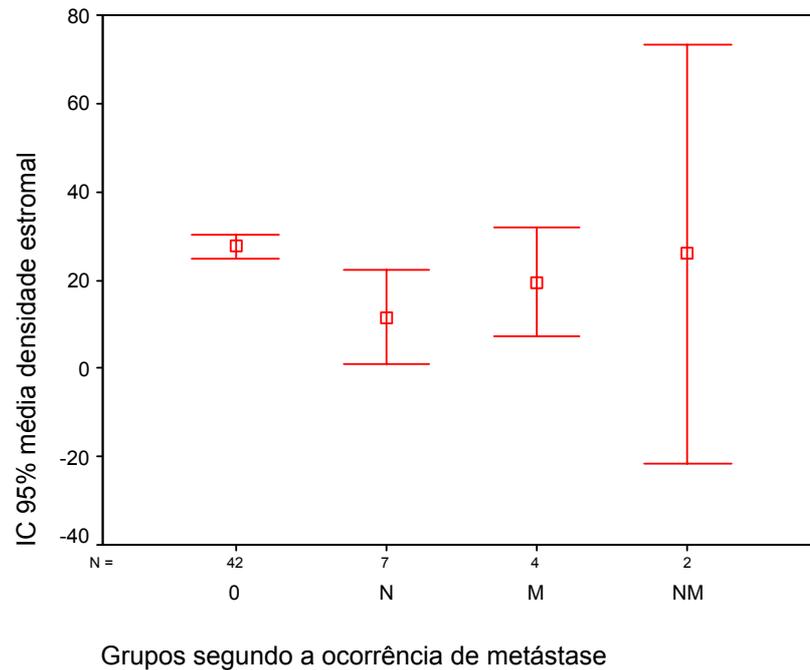
**Figura 14 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de fibras colágenas entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).**

LEGENDA: 0 = ausência de metástase; N = metástase linfonodal; M = metástase à distância; NM = metástase linfonodal e à distância. (ANOVA,  $p=0,009$ ).



**Figura 15 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão de fibras elásticas entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).**

LEGENDA: 0 = ausência de metástase; N = metástase linfonodal; M = metástase à distância; NM = metástase linfonodal e à distância. (ANOVA,  $p=0,001$ ).



**Figura 16 – Gráfico da comparação da média dos valores de expressão da densidade estromal entre grupos (segundo a ocorrência de metástase).**

LEGENDA: 0 = ausência de metástase; N = metástase linfonodal; M = metástase à distância; NM = metástase linfonodal e à distância. (ANOVA,  $p=0,001$ ).

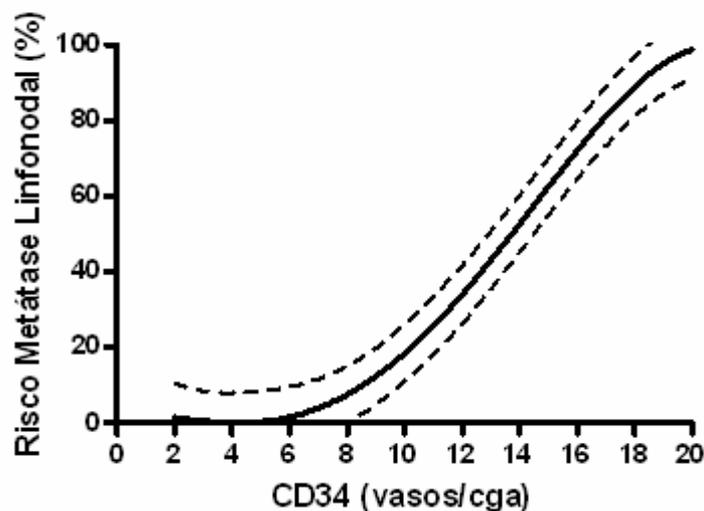
### 5.3.5 MARCADORES X SOBREVIVÊNCIA

Não houve correlação entre o índice de expressão de nenhum dos marcadores com as taxa de sobrevivência, global ou livre de doença.

## 5.4 ÍNDICE DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE METÁSTASE

### 5.4.1 ÍNDICE DE RISCO COM BASE NA ANÁLISE MULTIVARIADA POR REGRESSÃO LOGÍSTICA

Pela análise multivariada por regressão logística em degraus, o único fator independente associado à ocorrência de metástase foi a densidade de microvasos. Pela equação, cuja representação gráfica é mostrada na Figura 17, obteve-se um coeficiente  $\beta=0,3$ , com erro padrão de 0,1 ( $p=0,0001$ ). A constante para a equação foi de  $-5,2$  com erro padrão de 1,3 ( $p=0,0001$ ).



**Figura 17 – Curva que representa a equação do risco da ocorrência de metástase determinado para cada valor de dmV medido. (as linhas tracejadas representam 1 erro padrão)**

O segundo degrau de análise das variáveis em conjunto, excluindo-se a densidade de microvasos, não demonstrou associação de outro fator independente associado ao evento binário "metástase".

Não havendo outros fatores associados ao risco, pela análise multivariada, não se estabeleceu qualquer índice numérico ou equação para representar o risco de ocorrência de metástase. Não há como definir um índice com validade externa à casuística, baseado nesta análise.

## 5.4.2 PROPOSTA DE UM MODELO SIMPLIFICADO A SER DESENVOLVIDO

### 5.4.2.1 TRANSFORMAÇÃO DAS VARIÁVEIS CONTÍNUAS EM CATEGORIZADAS

A idade e os índices de expressão de cada marcador foram categorizados em dois grupos: acima e abaixo das respectivas médias.

### 5.4.2.2 DETERMINAÇÃO DA RAZÃO DE CHANCES DE CADA VARIÁVEL PARA A OCORRÊNCIA DE METÁSTASE

Para cada variável categorizada, idade, gênero e índice de expressão imunohistoquímica, determinou-se a razão de chances para a ocorrência de metástase (Tabela 7).

**Tabela 7 – Razão de chances da ocorrência de metástase para cada variável categorizada (base para a ponderação dos pontos)**

Variáveis		Razão de chances*
Clínicas	Idade elevada	3,3
	Gênero masculino	4,5
Celulares	Ki-67 elevado	5,1
	p53 elevado	3,7
	CD-34 elevado	5,1
Matriciais	Fibras colágenas (baixa densidade)	9,9
	Fibras elásticas (baixa densidade)	5,1

\*Estimativa de Mantel-Haenszel para razão de chances (*odds ratio*).

### 5.4.2.3 SOMATÓRIA DE PONTOS PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE RISCO DE OCORRÊNCIA DE METÁSTASE

Dados clínicos (idade e gênero) e dados histológicos (expressão de marcadores) categorizados como “acima da média” ou “abaixo da média”, são utilizados para a determinação do Índice de Risco. Para cada uma das variáveis: idade, gênero e expressão de marcadores são dadas notas ponderadas pela razão de chances (*odds ratio*), conforme a Tabela 8.

**Tabela 8 – Pontos a serem somados segundo cada variável categorizada para a determinação do índice de risco (ponderados pela razão de chances para ocorrência de metástase)**

Variáveis	Grupo de risco	Pontos para a soma	
Clínicas	Idade	<40	0
		≥40	3
	Gênero	Fem.	0
		Masc.	5
Celulares	Ki-67	<2,3	0
		≥2,3	5
	p53	<2,2	0
		≥2,2	4
Matriciais	CD-34	<8,4	0
		≥8,4	5
	Fibras colágenas	≥11,0	0
		<11,0	10
	Fibras elásticas	≥13,3	0
		<13,3	5

#### 5.4.2.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE RISCO DE OCORRÊNCIA DE METÁSTASE

O índice de risco (IR) é obtido pela soma dos pontos, e pode ser baixo, intermediário ou alto, conforme mostrado na Tabela 9.

**Tabela 9 – Índice de Risco (IR) para ocorrência de metástase**

Índice (IR) *	Risco
menor que 8	Baixo risco
de 8 a 20	Risco intermediário
maior ou igual a 20	Alto risco

\*Soma de pontos.

#### 5.4.3 RESULTADOS DO MODELO DE ÍNDICE DE RISCO PROPOSTO

##### 5.4.3.1 DESCRITIVOS

O índice de risco foi calculado para 55 doentes. O valor mínimo foi 0, o máximo 37, com média de 14,3 e desvio padrão de 10,9. A distribuição dos pacientes pelos grupos de risco baixo, intermediário e alto foi 15 (27,3%), 24 (43,6%) e 16 (29,1%).

##### 5.4.3.2 ÍNDICE DE RISCO DE OCORRÊNCIA DE METÁSTASE X METÁSTASE

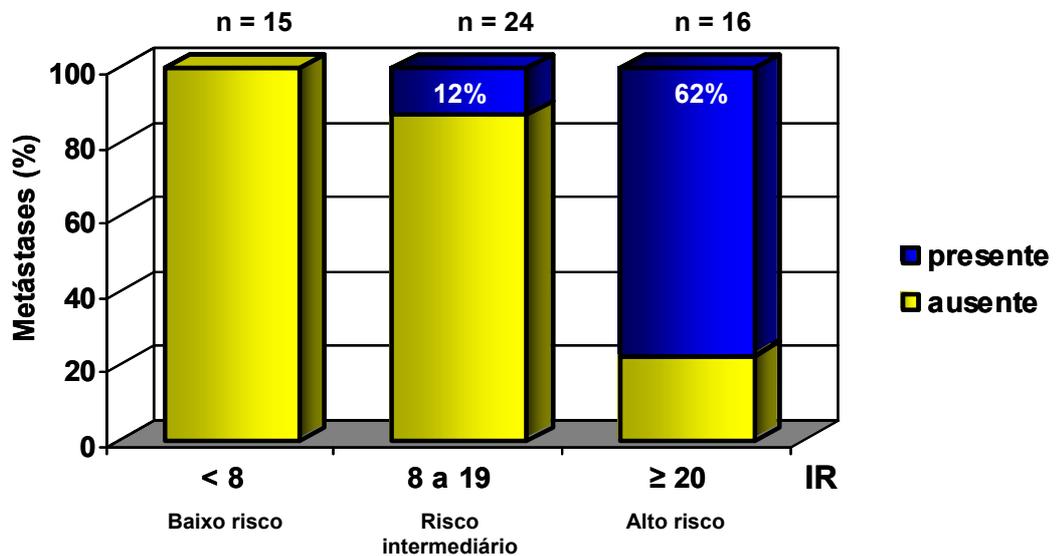
A ocorrência de metástase em cada grupo de risco é mostrada na Tabela 10 e na Figura 18.

O valor preditivo positivo do IR  $\geq 20$  para a ocorrência de metástase é de 62,5%. Além disso, 77% dos casos que apresentaram metástase possuem IR  $\geq 20$ .

**Tabela 10 – Ocorrência de metástase em cada grupo de risco**

Índice	Ocorrência de metástase		Total
	Ausente	Presente	
até 8 (%)	15 (100)	0	15
de 8 a 20 (%)	21 (87)	3 (12)	24
maior ou igual a 20 (%)	6 (37)	10 (62)	16
<b>Total (%)</b>	<b>42 (76)</b>	<b>13 (23)</b>	<b>55</b>

Teste do Qui-quadrado de Pearson,  $p \leq 0,0001$ .



**Figura 18 – Porcentagem de doentes que tiveram metástase em cada grupo de risco.**

## **6. DISCUSSÃO**

---

## **6. DISCUSSÃO**

A discussão foi realizada em 3 partes. A primeira discorreu sobre as limitações do trabalho, a segunda sobre o espectro das proliferações neuroendócrinas, e somente então, prosseguiu-se com a discussão dos resultados na mesma ordem que foram dispostos no capítulo de Resultados.

### **6.1 LIMITAÇÕES DO TRABALHO**

Para que se possa iniciar qualquer discussão sobre os resultados, é imperativo determinar as limitações do trabalho, para evitar análise de dados que não representem a realidade. Nesta parte discutir-se-á: exclusões, desenho epidemiológico de corte transversal retrospectivo, perda de seguimento antes de 5 anos, óbito por causas não correlacionadas, ausência da descrição pré-operatória de dados clínicos e radiológicos, dissecação linfonodal mediastinal, análise de linfonodos e limitações do estudo baseado na detecção de proteínas.

#### **6.1.1 EXCLUSÕES**

Houve 88 pacientes que não foram incluídos no estudo. Os motivos foram:

- do HCFMUSP (32 indivíduos): dos 9 pacientes operados a mais de 5 anos: 7 por terem tumor carcinóide atípico, 2 carcinoma neuroendócrino de grandes células. Outros 23 pacientes por não terem sido operados a mais de cinco anos. Neste último grupo, existem também casos de tumor carcinóide atípico.
- de outros Serviços (56 indivíduos): a recuperação dos espécimes histológicos provindos de outros serviços foi realizada no decorrer de três anos. Para que houvesse uniformidade no método de coloração e leitura das lâminas histológicas, aguardou-se para que fossem submetidos ao processo em um único momento. Este material está incluído nos projetos de pesquisa e nas teses de doutoramento em andamento no grupo de estudo de carcinomas neuroendócrinos.

A inclusão, nos próximos trabalhos, de pacientes operados nos últimos anos, que completarão 5 anos de seguimento, e daqueles provenientes de outros Serviços, aumentará a validade externa das conclusões do estudo.

O poder estatístico da análise multivariada por regressão logística foi diminuído devido ao número de eventos (metástase) observado. Somente a microdensidade de vasos foi definida como fator independente relacionada ao fenômeno. A análise univariada concluiu que a diferença entre as médias dos valores dos índices de expressão, para os outros 4 biomarcadores, entre o grupo com e sem metástase, deve ser aceita como significativa. O estudo da relação entre a idade dos pacientes e o fenômeno metastático também

deve ter sido prejudicado pelo número reduzido de pacientes incluídos no estudo.

Os pacientes continuam sendo seguidos e as Comissões de Ética dos hospitais que enviam seus doentes para o ambulatório deste Serviço deram parecer favorável à inclusão de novos indivíduos. Os novos trabalhos terão análises com maior poder estatístico e maior validade externa.

Provavelmente, a idade, o gênero e os 5 marcadores analisados poderão ter seu papel prognóstico validado, ou melhor elucidado, com o estudo do caso de pacientes que não se adequaram aos critérios de inclusão deste projeto.

### **6.1.2 DESENHO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO**

Considerando-se a casuística estudada, a primeira limitação que deve ser levada em conta é a referente ao desenho epidemiológico do estudo, retrospectivo de corte transversal. A aquisição de informações referentes a fenômenos ocorridos desde 1981 não possibilita a uniformidade da descrição de dados clínicos e radiológicos. E o estudo de corte transversal agregou doentes tratados de forma não uniforme no que se refere à dissecação linfonodal mediastinal e hilar ipsilaterais ao tumor, fato que não ocorre em estudos prospectivos controlados.

Com o estabelecimento do ambulatório especializado e de uma ficha padrão para a coleta de dados clínicos e dos exames de imagem,

uniformizou-se a aquisição de informações. Estas, já são utilizadas nos trabalhos em andamento.

Quanto à dissecação linfonodal (ver discussão adiante), as evidências advindas das pesquisas deste e de outros grupos poderão estabelecer a exploração mediastinal e hilar como procedimento padrão durante o ato operatório nos casos de tumores carcinóides.

### **6.1.3 PERDA DE SEGUIMENTO ANTES DE 5 ANOS**

Pacientes operados a mais de cinco anos, dos quais não há registro de imagem de exame tomográfico torácico, foram considerados como perda de seguimento antes de cinco anos. Dois pacientes não tiveram acompanhamento por cinco anos, ambos por óbito não correlacionado à doença. O motivo da inclusão destes dois indivíduos no estudo está discutido no item a seguir.

### **6.1.4 ÓBITOS NÃO RELACIONADOS**

Além da limitação do desenho do estudo, houve duas perdas de seguimento pós-operatório, por óbito não correlacionado, considerando-se o período mínimo de 5 anos. Uma paciente evoluiu a óbito por complicação operatória no segundo dia após o procedimento. A análise dos linfonodos mediastinais dissecados à operação, demonstrou a presença de metástase em um dos 20 linfonodos ressecados. Outro paciente faleceu por infarto

agudo do miocárdio 18 meses após a operação. Era acompanhado no ambulatório do serviço e, além do diagnóstico operatório de metástase em 1 dos 2 linfonodos mediastinais ressecados, também evoluiu com metástase à distância. A metástase era em clavícula direita, e foi diagnosticada após investigação de dor local. Irradiação do local não resultou em qualquer diminuição do volume da lesão ou dos sintomas.

A peculiaridade do segundo paciente ter evoluído com metástase linfonodal mediastinal e à distância antes do óbito, justificou a sua inclusão no estudo. Quanto à paciente, existe a crítica do desconhecimento do desenvolvimento de metástase à distância. O fato de haver acometimento linfonodal motivou o estudo dos espécimes histológicos referentes ao caso.

O terceiro caso de óbito não correlacionado ocorreu após 14 anos (168 meses) de seguimento pós-operatório, por infarto agudo do miocárdio. Seu estadiamento operatório linfonodal era N0, após a análise de 12 linfonodos ressecados. Foi submetido à necrópsia no Instituto do Coração do HCFMUSP, sem evidência de metástase à distância. Não se considerou o seguimento como perdido, devido ao tempo de acompanhamento de 14 anos.

#### **6.1.5 SINAIS E SINTOMAS PRÉ-OPERATÓRIOS**

A descrição de dados clínicos, como a duração de sinais e sintomas referentes ao carcinóide antes do ato operatório não foi realizada devido à mudança da história adquirida quando o paciente foi novamente entrevistado

anos após o evento. Ao comparar-se a história do prontuário, obtida no período pré-operatório, com a obtida ao retorno ambulatorial houve disparidade na duração de sintomas de até 7 anos entre ambas. Não houve uniformidade nos dados clínicos registrados no prontuário no período pré-operatório, e não foram confiáveis os dados obtidos anos após a operação, por isso não se completou a aquisição de dados referentes do tempo de duração de sinais e sintomas com estas últimas informações.

O número de episódios de pneumonia no período precedente à ressecção do carcinóide também não foi descrito devido ao mesmo problema de mudança da história obtida à anamnese no decorrer dos anos e à ausência do dado em alguns prontuários.

Mesmo informações referentes à ocorrência de hemoptise, pneumonia, dor torácica, dispnéia, febre ou emagrecimento, não coincidiam quando se comparou a história pré-operatória e a recuperada anos após o procedimento. É descrito que pacientes com dor torácica e emagrecimento têm pior prognóstico<sup>9</sup>.

Deve-se uniformizar a coleta de dados clínicos para que não se percam informações indispensáveis.

#### **6.1.6 EXAMES DE IMAGEM**

Dados referentes aos exames radiológicos pré-operatórios também não foram descritos devido à falta de registro dos mesmos para a maioria dos pacientes, tanto na forma de anotações em prontuários, como na forma de

apresentação dos exames ao retorno. Além disso, no período de 1982 a 1999, houve evolução dos métodos de tomografia computadorizada de tórax e da sensibilidade do exame para a detecção de linfonomegalia hilar e mediastinal<sup>146</sup>.

### **6.1.7 DISSECÇÃO LINFONODAL HILAR E MEDIASTINAL**

O desenho epidemiológico do estudo, retrospectivo, não permite a uniformidade de conduta quanto à exploração mediastinal. Na prática clínica, a dissecação linfonodal hilar e mediastinal ipsilateral não é obrigatória nos casos de ressecção de tumores carcinóides, pois não há evidência de que aumente o tempo de sobrevivência ou de que melhore a qualidade de vida dos pacientes<sup>8, 41, 43, 49, 71, 147, 148</sup>. Além disso, mesmo para os outros carcinomas primários pulmonares, não é consenso que se deva esvaziar radicalmente os linfonodos mediastinais. A exemplo da maioria dos Serviços ocidentais, o do HCFMUSP também não preconiza esse tipo de exploração mediastinal para todos os pacientes. Porém, o seguimento ambulatorial com exame clínico e tomografia computadorizada de tórax é realizado por no mínimo cinco anos.

Por isso, observa-se que não houve retirada de qualquer linfonodo durante o ato operatório em nove casos. Nos 46 casos de ressecção linfonodal, o número de estruturas retiradas variou de um a 25, refletindo a ausência de uniformidade no tipo de dissecação. Um protocolo de estudo

prospectivo, que defina a conduta ante à exploração mediastinal, é o desenho de estudo que permite a obtenção de uniforme ante este fator.

O seguimento dos doentes em longo prazo permite a detecção de metástases linfonodais, e é imperativo para o estudo do fenómeno em populações de indivíduos operados sem que tenham sido submetidos à exploração mediastinal<sup>146</sup>.

Dos 88 pacientes que não foram incluídos no estudo, 23 o foram pelo único motivo de terem sido operados a menos de 5 anos, o que torna impossível, nestes doentes, qualquer análise do *status* linfonodal quanto ao acometimento neoplásico<sup>149</sup>.

Para que um paciente fosse incluído na casuística, houve obrigatoriedade de seguimento pós-operatório com tomografia computadorizada, realizada a mais de cinco anos da data do procedimento cirúrgico. As imagens das tomografias destes pacientes não demonstram qualquer linfonomegalia hilar ou mediastinal. Além disso, à exceção de uma paciente, que reside e é acompanhada por pneumologista na cidade de São Vicente e mantém apenas contato telefônico com a equipe do ambulatório de carcinomas neuroendócrinos, outros 7 pacientes retornam semestralmente e mantém contato com a equipe. Ao serem examinados pelos cirurgiões torácicos do ambulatório, não apresentaram sinais ou sintomas de recidiva. Um paciente evoluiu a óbito no terceiro mês por metástase hepática e, à necropsia, não havia acometimento linfonodal.

Os pacientes deste estudo não apresentaram desenvolvimento de imagens tomográficas compatíveis com linfonodos aumentados no decorrer

do seguimento. Porém, é possível que haja metástase em linfonodos com diâmetro menor que 2 cm, dimensão esta considerada como limite entre a normalidade e a megalia neste serviço. Além disso, mesmo que pouco possível, o surgimento de metástases tardias ainda pode ocorrer entre indivíduos da casuística.

Em resumo, o Serviço de cirurgia torácica do HCFMUSP não preconiza o esvaziamento radical linfonodal para todos os pacientes acometidos por carcinoma, em concordância com a maioria dos serviços ocidentais, porém, determina que todos os doentes sejam seguidos por pelo menos cinco anos, em ambulatório especializado. O seguimento pós-operatório inclui exame clínico e tomografia computadorizada de tórax. O mesmo tipo de acompanhamento foi utilizado como critério para que o doente incluído no estudo. Isso explica o fato da exclusão da casuística, dos pacientes operados a menos de cinco anos.

A ocorrência de metástases linfonodais mediastinais durante o seguimento pós-operatório é um fenômeno raro<sup>150</sup>. No ambulatório especializado deste Serviço, observaram-se dois casos entre 143 doentes acompanhados (incluindo-se casos de tumor carcinóide típico e atípico). Nenhum dos dois casos consta deste estudo, pois um deles apresenta neoplasias endócrinas múltiplas (fator de exclusão), e não está claro se o fenômeno é decorrente de metástase, recidiva ou segundo tumor primário. Provavelmente trata-se de recidiva local após ressecção de carcinóide atípico tímico, que foi retirado no mesmo ato operatório que uma massa pulmonar em lobo superior esquerdo, que era um carcinóide típico. O outro

paciente, uma mulher operada para o tratamento de tumor carcinóide atípico (fator de exclusão) em lobo pulmonar inferior direito, apresentou linfonodomegalia mediastinal no sexto mês pós-operatório e foi submetida à mediastinoscopia com biópsia. Confirmou-se o diagnóstico de metástase do tumor pulmonar. Esta paciente também apresenta lesão expansiva em glândula supra-renal direita, e está em preparação pré-operatória para a realização de biópsia.

### **6.1.8 ANÁLISE DOS LINFONODOS**

Aceita-se como definição para o acometimento de um linfonodo por metástase, a presença de populações celulares neoplásicas do tecido tumoral primário à análise microscópica à coloração pela técnica de HE. Porém, é aceita como definição de ausência de metástase, a não detecção destas células pela coloração. É sabido que mesmo linfonodos que não apresentam critérios de acometimento pelo método, podem conter células metastáticas. O fenômeno detectado por técnicas como imunohistoquímica ou imunofluorescência *in situ*, é denominado micrometástase.

No caso de carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares, reações imunohistoquímicas para cromogranina-A, enolase neurônio específica e sinaptofisina determinam a presença de células tumorais. Se realizadas no tecido de linfonodos com micrometástase, evidenciam o fenômeno.

O Professor Doutor João Aléssio Juliano Perfeito incentivou a procura de micrometástase (e disponibilizou os tecidos linfonodais ressecados no

Serviço de Cirurgia Torácica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal Paulista, para enriquecer a casuística do HC-FMUSP). O grupo de estudos de carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares do Hospital das Clínicas da FMUSP, ao estudar a presença de acometimento linfonodal pela coloração de HE e pela imunohistoquímica descrita, diagnosticou micrometástases em alguns casos. O estudo prossegue e é desenvolvido como Projeto de Iniciação Científica do acadêmico Leandro Luongo de Matos.

A análise de toda a casuística à luz desta técnica de estadiamento deve ser realizada para a melhor compreensão do comportamento destes tumores. À revisão da literatura, não há relatos de micrometástase em linfonodos mediastinais de pacientes operados para o tratamento de tumor carcinóide broncopulmonar, daí a impossibilidade de se concluir o impacto clínico que o fenômeno poderia ter.

#### **6.1.9 LIMITAÇÕES DE ESTUDOS BASEADOS NA ANÁLISE DE PROTEÍNAS**

As técnicas de imunohistoquímica baseiam-se na afinidade de anticorpos por determinadas áreas de uma macromolécula protéica. Estas áreas podem estar presentes sem qualquer alteração em proteínas selvagens ou mutadas. Esta área na qual se liga o anticorpo é chamada de epítopo<sup>151</sup>.

Conclui-se que a mera afinidade de um anticorpo por um epítopo de uma proteína não assegura que toda a estrutura desta macromolécula esteja íntegra. Se o que se quer detectar é a presença de proteínas funcionantes, deve-se analisá-las em ensaios que verifiquem tal fenômeno. Porém, estes ensaios não são utilizados de rotina em laboratórios de patologia clínico-cirúrgica.

Por isso, em estudos que tenham por objetivo a determinação de marcadores imunohistoquímicos para uso na prática clínica, deve-se utilizar anticorpos já consagrados pela reconhecida correlação entre sua marcação tecidual e um evento biológico de interesse. No presente estudo foram utilizados anticorpos contra epítomos já bem estudados, porém proteínas que apresentem mutações em segmentos que não interfiram na afinidade anticorpo-epítopo também podem ser marcadas.

Para resolver tal problema, técnicas de análise da seqüência dos ácidos nucléicos do DNA ou do RNA mensageiro têm sido cada vez mais utilizadas. Um dos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de estudo de carcinomas neuroendócrinos do HCFMUSP, realizado pelos doutores Alexandre Muxfeldt Ab'Saber e Estela Novak, consiste no estudo da expressão e da morfologia do RNA mensageiro do gene VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nestes tumores, e correlaciona estes dois fatores com a densidade de microvasos e o potencial metastático das neoplasias.

A maior desvantagem do estudo dos ácidos nucléicos em relação ao das proteínas é a técnica de extração do RNAm dos tecidos. A desnaturação desta molécula ocorre em minutos caso o tumor não seja conservado em

nitrogênio líquido ou em meio de preservação específico, ao passo que o fenômeno não ocorre com as proteínas, mesmo que o tecido fique exposto à temperatura ambiente por horas. Durante a fase piloto do projeto mencionado, houve desnaturação do RNAm em tumores que foram resfriados em nitrogênio líquido com 5 minutos de latência entre a retirada da peça operatória e o acondicionamento.

Ainda referente a esse projeto, está em desenvolvimento uma técnica de extração de RNAm de tecidos emblocados em parafina, porém os testes não estão sendo realizados em espécimes de tumor carcinóide. O motivo é que a técnica utiliza uma quantidade de tecido neoplásico que consumiria toda a amostra, e o carcinóide é um tumor raro. Os testes são realizados em tecidos de camundongos. Outro fator que torna o estudo de ácidos nucléicos menos aplicável na prática clínica, quando comparado ao de proteínas, é o custo.

## **6.2 O ESPECTRO DAS PROLIFERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS BRONCOPULMONARES**

Sob a denominação de tumores carcinóides típicos encontram-se todas as proliferações de células de Kulchitsky com diâmetro maior que 5 mm, que não apresentem áreas de necrose ou invasão de tecidos adjacentes e cujo número de células em mitose não ultrapasse dois a cada observação de 10 campos microscópicos de grande aumento<sup>1</sup>. Quando estes aglomerados

celulares não ultrapassam o diâmetro de 5 mm, são arbitrariamente definidos como Tumorlets.

Todo tumor carcinóide já teve dimensões que o definiria como Tumorlets<sup>20</sup>, caso tivesse sido ressecado antes de ultrapassar tal limite. Assim também, não há estudo que prove a incapacidade de formações hiperplásicas neuroendócrinas de atingirem diâmetros maiores que o acima estabelecido.

A forma definitiva de se caracterizar uma célula como neoplásica, quando seu aspecto fenotípico bem diferenciado a confunde com suas pares hiperplásicas, é demonstrar alterações estruturais genômicas. Neoplasia é uma doença caracterizada por tais alterações, enquanto que hiperplasias apenas denotam funcionamento acelerado dos processos de divisão celular<sup>88</sup>.

Talvez, entre todos os tumores que são diagnosticados atualmente como carcinóides, existam entidades nosológicas verdadeiramente neoplásicas e outras apenas hiperplásicas.

Entre os pacientes acompanhados no ambulatório especializado e inclusos na casuística do estudo, dois casos exigem descrição detalhada. Um deles é um paciente que após o diagnóstico histológico de carcinóide típico central por biópsia endobrônquica, negou o tratamento por acreditar que evoluiria de forma desfavorável, uma vez que seu pai foi operado por um "câncer de pulmão" e não foi curado. Apesar das informações de que não tinha doença comparável a do seu pai, permaneceu 7 anos sem aceitar a ressecção. No sétimo ano após o diagnóstico, resolveu procurar

novamente serviço médico para ser operado. Recebeu tratamento, a análise histológica não apresentou acometimento linfonodal ou invasão de tecidos adjacentes; permanece em acompanhamento sem sinais de recidiva ou metástase. Outro caso é de uma paciente que apresentava tosse não produtiva por 30 anos, com episódios de pneumonia desde o início do quadro. Após ser operada de um tumor carcinóide típico endobrônquico, não apresentou mais tosse ou pneumonia. Não apresentou acometimento linfonodal e permanece sem evidência de metástase.

É impossível afirmar que no segundo caso a causa da tosse e das pneumonias era a presença do tumor endobrônquico ressecado 30 anos mais tarde, porém no primeiro caso, há registro da lesão por 7 anos. Nestes dois casos, assim como na maioria dos pacientes, recupera-se história e até mesmo exames radiológicos compatíveis com a presença do tumor durante longos períodos. Mesmo assim, não se observa invasão de tecidos adjacentes ou metástase.

Em contrapartida, uma paciente do estudo, que apresentou metástase para 2 dos 14 linfonodos mediastinais dissecados durante sua operação, tinha como tumor primário um tumor de 5 mm de diâmetro, dimensão limítrofe entre os diagnósticos de Tumorlets e tumor carcinóide típico. O mediastino foi explorado devido à linfonomegalia diagnosticada à tomografia computadorizada de tórax.

Enquanto não for definido um critério objetivo que diferencie neoplasia de hiperplasia neuroendócrina broncopulmonar, não há como afirmar que todos estes indivíduos possuíam um carcinoma neuroendócrino bem

diferenciado. Somente o estudo da integridade do genoma das células de Kulchitsky pode solucionar tal questão, pois neoplasia, por definição, é uma doença resultante de alterações estruturais da seqüência de ácidos nucléicos que compõem a molécula de DNA.

### **6.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS DADOS DA CASUÍSTICA X METÁSTASE**

#### **6.3.1 GÊNERO X METÁSTASE**

Em números absolutos, os carcinóides típicos acometem preferencialmente mulheres<sup>47, 148, 152, 153</sup>, enquanto os atípicos, os homens. Estudos que incluem os dois tipos de tumor divergem quanto a predominância por gênero, porém, ao analisar-se a população de doentes quanto ao tipo histológico, evidenciam-se as diferenças<sup>154</sup>. Porém, a relação entre a incidência por gênero não é pronunciada a ponto de gerar diferenças significantes. Se for desenvolvida uma nova classificação destes tumores por grau de agressividade, é possível que a entidade nosológica mais benigna acometa preferencialmente mulheres<sup>9</sup>.

Neste estudo, a ocorrência de metástase foi de 39% entre os homens e de 12,5% entre mulheres. Aliando-se a esta observação, o fato de que carcinóides atípicos predominam em homens, e o de que há carcinóides atípicos que não geram metástase, é discutível se o termo arbitrário típico e atípico é suficiente para definir entidades nosológicas. É possível que haja

uma entidade que predomina em mulheres e que seja mais benigna, e que pela classificação atual, ora é chamada de hiperplasia, ora de carcinóide típico, ora de atípico (ver item 6.3.2).

A estipulação de um evento incontestável que defina um tumor como maligno, é o melhor meio de se elucidar a questão das classificações. A capacidade de gerar metástase é um evento incontestável que define um tumor carcinóide como maligno.

### 6.3.2 IDADE X METÁSTASE

Um dos objetivos do estudo foi determinar se havia correlação entre a idade e a ocorrência de metástase, pois em pacientes mais idosos, os carcinóides são mais agressivos<sup>9, 47, 148</sup>. Observa-se que a faixa etária de indivíduos com carcinóide típico é mais baixa que a daqueles com atípico<sup>155</sup>.

Ao serem analisados os pacientes em dois grupos etários arbitrários: abaixo e acima da média de idade geral da casuística, houve menor incidência de metástase no grupo mais jovem, porém o Teste Exato de Fisher não determinou diferença significativa entre os valores ( $p=0,067$ ). A ausência de significância não corresponde à impressão clínica, e o fato deve ser consequência do número de pacientes estudados. A representação gráfica das idades dos doentes, quando separada por gênero, esboça um padrão bimodal (Figura E1 - Anexo E). Talvez, o aumento da casuística demonstre uma exacerbação do padrão, remetendo à suspeita de haver duas doenças distintas sob o diagnóstico de tumor carcinóide típico.

Observa-se também que houve diferença significativa entre a média da idade das mulheres (35,2 anos), e dos homens (46,3 anos).

A predominância de tipos histológicos mais benignos entre mulheres e indivíduos mais jovens e, mais malignos entre homens e indivíduos mais velhos, pode refletir a diferença entre a faixa etária de acometimento entre os gêneros, remetendo novamente à hipótese de existirem duas entidades nosológicas distintas: uma que acomete preferencialmente mulheres jovens e outra homens mais velhos.

### **6.3.3 CENTRAL E PERIFÉRICO X METÁSTASE**

À exceção de um trabalho<sup>9</sup>, a revisão da literatura remete ao conceito de que a localização periférica dos tumores carcinóides, em contrapartida à endobrônquica, tem correlação com maior malignidade<sup>47</sup>. Porém, nenhum dos trabalhos revistos observou esta diferença quando considerados somente os tumores carcinóides típicos segundo a classificação atual, aqueles com menos de 3 mitoses em 10 CGA microscópicos<sup>148</sup>. Os trabalhos consideram os tumores típicos e atípicos em conjunto, porém sabe-se que apesar de ambos serem preferencialmente doenças de brônquios mais centrais, os atípicos são menos incomuns em posição periférica que os típicos, o que explica o viés de uma análise geral. Outro fator a ser considerado, é que os relatos anteriores à reclassificação proposta por Willian Travis, descreve as neoplasias com 3, 4 ou 5 mitoses

em 10 CGA microscópicos como tumores carcinóides típicos, e atualmente, são definidos como atípicos.

Neste estudo, a incidência de metástase no grupo de indivíduos com tumores centrais foi de 23,4% (11/47) e com tumores periféricos foi de 25% (2/8), fato que talvez seja explicado pela eliminação do fator de confusão provocado pela análise em conjunto dos subtipos de tumores carcinóides mais agressivos.

Outro fator de confusão que poderia explicar a pior evolução dos tumores carcinóides típicos periféricos, é o fato de terem tendência a permanecerem assintomáticos até atingirem dimensões que os tornariam sintomáticos em posição central. Lesões mais centrais tenderiam a causar sintomas obstrutivos mais precocemente, além de tosse e hemoptise. A forma de elucidar a questão é comparar a evolução dos tumores carcinóides típicos periféricos e centrais segundo suas dimensões. Se tumores com o mesmo diâmetro, independentemente da localização, comportarem-se de forma semelhante, as dimensões da lesão podem representar o fator de confusão.

Dos 55 casos estudados, 47 tumores eram centrais e 8 periféricos. O valor médio do diâmetro dos primeiros foi de 29,8 mm e dos periféricos 27,9 mm, não havendo diferença significativa entre os grupos. Também não houve correlação entre a ocorrência de metástase e o diâmetro do tumor (ver item seguinte: dimensões do tumor x metástase). Dado que não houve diferença quanto à ocorrência de metástase quando comparados os grupos de doentes com lesões nas duas localizações, no estudo não houve

comportamento mais agressivo dos tumores periféricos. Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Okike<sup>156</sup>, Davila<sup>157</sup> e McCaughan<sup>65</sup>.

#### **6.3.4 DIMENSÕES DO TUMOR X METÁSTASE**

Conforme discutido no item anterior, deve-se verificar se os tumores com maiores dimensões têm maior chance de gerar metástase, como sugerido por alguns autores<sup>6, 9, 65</sup>.

No presente estudo, não houve correlação entre as variáveis, o que corrobora os achados de Okike, Torre, Schreurs e Schrevens<sup>45, 47, 48, 148</sup>. Como ilustração, observou-se que o menor tumor estudado, de 5 mm, ocasionou metástase para 2 dos 14 linfonodos ressecados; e um dos três tumores de 7 cm de diâmetro (o maior diâmetro observado foi 70 mm) não enviou metástase para nenhum dos 9 linfonodos retirados, mesmo após 10 anos de acompanhamento.

O motivo do estudo da correlação entre maior diâmetro e volume da lesão, foi descartar a hipótese deste diâmetro ser um parâmetro que não traduzisse a heterogeneidade dos três diâmetros que representam os tumores. A localização endobrônquica da neoplasia determina a forma elipsoidal, que é representada por três diâmetros, tanto mais distintos entre si quanto maior a excentricidade da elipse que representa a lesão. No caso do tumor apresentar grande excentricidade de forma, com disparidade entre seus três diâmetros, o maior diâmetro pode não ser um indicador confiável do volume. Porém, o estudo da correlação entre o maior diâmetro (medida

mais utilizada na literatura<sup>6)</sup> e o volume, demonstrou haver correlação entre as variáveis também no caso dos carcinóides típicos. Utilizou-se, então, a medida mais difundida nos trabalhos científicos para representar as dimensões tumorais: o maior diâmetro.

Os marcadores teciduais para proliferação celular, apoptose e angiogênese poderiam não ter correlação com a ocorrência de metástase no caso de tumores maiores produzirem este fenômeno com maior incidência. Isso porque o aumento das dimensões tumorais dá-se, no caso dos carcinóides, somente pela multiplicação celular, que se relaciona diretamente com o aumento da taxa proliferativa e angiogênese, e com a diminuição da taxa de apoptose. Neste caso, os marcadores poderiam marcar apenas a capacidade do tumor aumentar de volume e este sim, poderia ser o único fator relacionado à maior ocorrência de metástase. Porém, observou-se que os marcadores são indicadores independentes para o aumento do potencial metastático.

Outro grupo de estudos de tumores carcinóides, que abrange cirurgias torácicas argentinos e uruguaios, também relata em sua experiência no seguimento de 38 pacientes, que não houve correlação entre o diâmetro tumoral e a ocorrência de metástase. Em discussão referente ao trabalho de Silva e colaboradores<sup>50</sup>, ocorrida na Academia Argentina de Cirurgia em 1993, o Dr. Enrique S. Caruso, em resposta à mesma questão, conclui baseado em sua casuística, que " ...mais que ao tamanho da lesão, nossa análise sugere que a evolução com metástase linfonodal está relacionada à atipia da lesão".

Outros fatores que contribuem para o acréscimo de volume em outros tipos de tumor são: sangramento ou infecção intra-parenquimatosos, necrose e produção de muco ou colóide. Em tumores carcinóides típicos, nenhuma destas entidades se faz presente.

### **6.3.5 MARGEM CIRÚRGICA COMPROMETIDA POR TUMOR X METÁSTASE**

Presença de células neoplásicas na margem de ressecção cirúrgica ocorreu em 9 dos 55 pacientes. Destes, 3 evoluíram com metástase hematogênica (33,3%). No grupo de 46 doentes com margem livre de neoplasia, 6,5% (3/46) destes evoluíram com metástase à distância. O risco relativo para o acometimento metastático entre os dois grupos é mais de 4 vezes maior para o primeiro.

Não se considerou acometimento linfonodal pelo tumor como fenômeno associado ao comprometimento neoplásico da margem cirúrgica. Isso, pelo fato de todos os linfonodos positivos para células malignas terem sido ressecados neste mesmo ato operatório. No seguimento pós-operatório de no mínimo 5 anos, não se observou qualquer indício clínico ou radiográfico de linfonodomegalia mediastinal ou hilar. É impossível que o fato de haver células no limite da ressecção tenha gerado acometimento dos linfonodos durante a operação, pois a quantidade de células observadas nas estruturas hilares e mediastinais representam verdadeiras colônias tumorais já estabelecidas e não apenas êmbolos em trânsito para os linfonodos.

O fato mais intrigante é o de não ter havido registro de sinais ou sintomas de recidiva tumoral no coto brônquico ou na linha de anastomose, nem em prontuário, nem durante a entrevista e o exame clínico realizados no ambulatório especializado. O seguimento dos 9 pacientes foi de: 166, 163, 153, 151, 146, 90, 82, 79 e 18 meses. O doente seguido por 18 meses, evoluiu a óbito por infarto agudo do miocárdio, e apresentou metástases linfonodais à operação e à distância no decorrer do seguimento.

Discutir como evitar a ressecção operatória incompleta é mais importante que discutir a conduta pós-operatória quando a margem for comprometida. Porém, há uma tendência a não reabordar pacientes com tumor presente microscopicamente na margem ressecada sem evidências macroscópicas, radiológicas ou endoscópicas, de recidiva<sup>41, 49, 50, 148</sup>. A congelação da margem de ressecção para a análise microscópica intra-operatória é o método preconizado para que se evite o fato. Apesar do brônquio ser composto por tecido cartilaginoso, é possível realizar a congelação e preparação do tecido para observação histopatológica.

### **6.3.6 TNM X METÁSTASE À DISTÂNCIA**

Novamente considerou-se somente a metástase à distância para a análise entre o estadiamento e o fenômeno. Como no item anterior, deve-se considerar que todos os linfonodos acometidos pela doença foram diagnosticados no ato operatório, e que durante o seguimento ambulatorial não houve sinais, sintomas ou evidência radiológica de tumor mediastinal.

Harpole<sup>9</sup>, em 1992, concluiu que houve correlação entre o estadiamento TNM e a ocorrência de metástase em uma casuística de 126 doentes (incluindo casos de carcinóide típico e atípico). Em 2003, Mezzetti<sup>158</sup> chegou à mesma conclusão.

Na presente pesquisa não houve correlação entre o estadiamento TNM e o fenômeno metastático, resultado semelhante ao encontrado por Schreurs<sup>148</sup>, em 1992, ao acompanhar 93 indivíduos de tumor carcinóide típico por mais de 20 anos. A não correlação deve-se a 3 fatores: ambas as casuísticas incluem somente pacientes com tumor carcinóide típico, o determinante "T" do estadiamento é elevado (T3, T4) para qualquer neoplasia broncopulmonar central (mesmo que de baixo grau de malignidade), e por fim, entre os indivíduos com a variante típica do tumor, predomina o estadio precoce.

A predominante localização das células e corpos neuroendócrinos nos brônquios principais e lobares (incluso o intermédio), determina a localização central da maioria dos tumores carcinóides típicos. O crescimento endoluminal das lesões predispõe à obstrução brônquica e à atelectasia. O colapso de todo um pulmão define o estadiamento T como T3, que mesmo que não seja acompanhado por acometimento linfonodal, classifica o doente no grupo IIB. Dos 10 pacientes do grupo de estadiamento T3, 8 não apresentaram metástase hematogênica.

O outro fator de viés, o predomínio do estadio precoce, explica a ocorrência de metástase à distância em 4 doentes do estadio I (A ou B), 1 do

IIB e 1 do IV, sendo este último caso referente a um possível desenvolvimento síncrono de tumores em lobos pulmonares diversos.

Pelo exposto, o estadiamento TNM não representa adequadamente o prognóstico dos pacientes acometidos pela variante típica dos tumores carcinóides broncopulmonares.

## **6.4 DISCUSSÃO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA**

### **6.4.1 SOBREVIVÊNCIA GLOBAL**

De acordo com o revisto da literatura médica, o tempo de sobrevivência para um paciente tratado de tumor carcinóide típico tende a ser longo<sup>9, 43, 149, 159</sup>. Na maioria das vezes, a obtenção da cura faz com que a história natural de vida não seja alterada<sup>41, 42, 49</sup>.

Ao estudo desta casuística, a taxa de sobrevivência global dos pacientes em cinco anos foi de 96,3%.

Dois pacientes evoluíram a óbito decorrente do tumor carcinóide típico por metástase hepática, dentro do período de 5 anos de seguimento.

Um deles possuía metástase para 3 de 3 linfonodos mediastinais dissecados, e o outro não apresentou acometimento linfonodal. Este foi submetido à necrópsia pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, tendo os linfonodos mediastinais explorados, por ter tido como causa do óbito o acometimento hepático por metástase do tumor. À necrópsia, o

acometimento metastático hepático foi confirmado e não houve acometimento de outros órgãos pela doença.

#### **6.4.2 SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA**

Para o estudo do tempo de sobrevivência livre de doença, considerou-se o fenômeno de acometimento por metástase linfonodal e metástase à distância.

Dado que todos os casos de comprometimento linfonodal pela doença foram diagnosticados ao momento operatório, para o estudo da sobrevivência livre de doença considerou-se a ocorrência de metástase hematogênica.

Em 4 casos as metástases à distância ocorreram comprovadamente no período de 5 anos. Um dos casos considerado como metástase que ocorreu após 5 anos (em 5 anos e meio), é referente a um paciente que evoluiu com nódulo para cardíaco, ipsilateral ao procedimento cirúrgico: bilobectomia inferior por tumor carcinóide em brônquio intermédio. À segunda exploração, observou-se a lesão na gordura pericárdica, em região pouco propícia à aparição de linfonodos. A análise microscópica elucidou o caso: tratava-se de tumor carcinóide típico, mas não havia tecido linfonodal ao redor do tumor. Provavelmente, trata-se de implante e não metástase, mas o estudo broncoscópico do coto brônquico não demonstra qualquer sinal de recidiva. A revisão da margem brônquica referente à primeira operação

(bilobectomia), também não demonstrou células neoplásicas remanescentes.

Uma paciente teve metástase para a glândula tireóide após 5 anos de seguimento, porém o tumor foi um achado ao exame de tomografia computadorizada de tórax e nos 2 anos anteriores a paciente não realizou o exame. Não se sabe quando apareceu a imagem correspondente à metástase.

Além do caso de metástase ou implante na gordura pericárdica, há outro caso discutível de metástase à distância. Trata-se de um paciente com dois carcinóides, um em cada lobo pulmonar. Pela classificação proposta pela UICC, considera-se metástase carcinomas pulmonares do mesmo tipo histológico localizados em lobos diferentes. Porém, não há como afirmar que se trata de metástase. É descrito o caso de diversos tumores, multicêntricos, compostos de células neuroendócrinas, como os Tumorlets<sup>160</sup>. Pode ser este o caso deste doente.

## **6.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS RELATIVOS AOS ÍNDICES DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES TUMORAIS**

### **6.5.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DOS MARCADORES**

O estudo dos tecidos tumorais foi realizado pelo método de imunohistoquímica ou por técnicas de quantificação de fibras da matriz extracelular. Para a contagem de células marcadas pelo primeiro método, é necessário um cuidado metodológico quanto à preparação das lâminas

histológicas. Em todas as baterias para a preparação dos espécimes, deve-se realizar a coloração de lâminas padrão, utilizadas como controle positivo das reações<sup>4</sup>.

A ausência de marcação à observação microscópica de tecidos submetidos à técnica imunohistoquímica pode representar um entre dois fenômenos: ausência de expressão protéica ou falha de técnica. O controle positivo realizado pela coloração de um tecido que sabidamente expressa a proteína, evita a leitura de lâminas inadequadas. Cada anticorpo monoclonal utilizado no estudo, tem um tecido padrão para controle positivo. Os laboratórios que produzem os anticorpos discriminam na bula qual deve ser o tecido testado. Todos os casos foram corados em baterias com tais controles.

Os marcadores celulares Ki-67 e p53 não são expressos em todos os casos, pois tumores hiperplásicos ou neoplásicos bem diferenciados, não apresentam taxa proliferativa alta o suficiente para que se detecte o primeiro marcador, além de não terem como característica a mutação da proteína nuclear p53. Dos 11 pacientes cujos tumores não apresentaram marcação nem para o Ki-67 e nem para o p53, 9 não evoluíram com qualquer metástase.

O caso de uma paciente de 18 anos, cujo tumor não apresentou marcação para o Ki-67 nem para o p53, e que evoluiu com metástase linfonodal, pode representar um exemplo do fenômeno descrito por Mandriota<sup>105</sup>. O autor defende que existem células bem diferenciadas com potencial metastático. Isso ocorreria caso o parênquima tumoral pudesse

induzir a produção de uma grande quantidade de vasos ao seu redor e tivesse capacidade de sobreviver na circulação e no tecido de um linfonodo ou órgão à distância. O que chama a atenção à análise microscópica deste tumor, é a quantidade de microvasos que circundam as células neoplásicas (este foi o tumor no qual foi observada a maior densidade de microvasos deste estudo: 21 em 10 CGA). Para verificar a presença do fenômeno descrito pelo autor, é necessário que se estude a produção de fatores angiogênicos pela célula. O fator mais provável de ser o responsável é o VEGF<sup>113</sup>. Está em andamento a tese da doutoranda deste Programa, Mariana Toselo Lalloni, que versa sobre a expressão imunohistoquímica do VEGF nestes pacientes.

Para a identificação da expressão citoplasmática da proteína Bcl-2, também se utilizou marcação de lâminas como controle interno positivo. A não marcação em quatro casos sem e em um caso com metástase, foi interpretada como baixa concentração da molécula intracelular e não como falha do método.

As estruturas extracelulares estudadas: microvasos, fibras colágenas e elásticas, estão presentes em todos os tumores carcinóides, por isso não há a possibilidade da ausência de marcação. Qualquer ausência de marcação seria interpretada como falha do método, porém todos os casos apresentaram positividade.

## 6.5.2 MARCADORES X MARCADORES

A célula, neoplásica ou não, é uma entidade viva complexa. Os diversos aparelhos e sistemas que compõem os indivíduos pluricelulares têm seus representantes em cada célula.

Como no homem, os aparelhos e sistemas interagem entre si. O processo de divisão celular, por exemplo, com sua demanda energética, exige que substratos como oxigênio, glicídios, aminoácidos e água cheguem à célula. Este aporte é possível graças à microvasculatura. A elevada taxa proliferativa de tecidos neoplásicos exige neovascularização<sup>106, 113</sup>. Por isso, é esperado que tumores com maior expressão de Ki-67, tenham maior densidade de microvasos<sup>115</sup>.

Estas células em proliferação com microvasos ao seu redor, têm maior probabilidade de apresentarem mutações da proteína nuclear p53, que tecidos são<sup>106</sup>. As mutações pró-neoplásicas só poderão produzir lesões tumorais no caso da perda da capacidade celular de entrar em apoptose ante à instabilidade genômica. Todos esses fenômenos ocorrem em conjunto e podem ter correlação entre si<sup>55, 84, 90</sup>.

O estudo das correlações entre a expressão de cada marcador com todos os outros não é objetivo deste trabalho, porém, foram realizadas as análises para a verificação da possibilidade da determinação do índice numérico de risco para a ocorrência de metástase.

Para a determinação de um índice que utilize vários marcadores, é imperativo que se aplique métodos estatísticos de regressão logística para análise multivariada. Isso impede que a interação entre cada fenômeno

estudado, pela quantificação da expressão de um determinado marcador, seja ignorada. Caso isto ocorra, incorre-se no erro de somar-se ao índice valores irreais.

A tabela (D1) com a correlação entre a quantificação de cada marcador está disposta Anexo D.

A presença de correlações exige que o índice com validade externa ao trabalho seja resultado do método estatístico descrito.

Pela análise multivariada, utilizando-se o método de regressão logística, para definir a correlação entre cada marcador e o fenômeno metastático, observa-se que a variável independente correlacionada à ocorrência de metástase é a microdensidade de vasos.

O resultado será mais bem discutido ao descreverem-se os índices de risco para a ocorrência de metástase.

### **6.5.3 MARCADORES X DIMENSÕES TUMORAIS**

A ausência de correlação entre os valores numéricos (em mm<sup>3</sup> ou mm), de volume ou diâmetro tumoral, e os valores dos índices de expressão imunohistoquímica ou morfométricos dos biomarcadores, já foi discutido parcialmente no item "dimensões tumorais x metástase".

A relevância da ausência de correlação é descartar-se que quanto maior o diâmetro tumoral, maiores seriam os valores dos índices para os biomarcadores. Caso isso ocorresse, juntamente com correlação positiva entre os valores das dimensões tumorais e a incidência de metástase (que

também não ocorreu), haveria o risco de o único fator relacionado ao evento metastático ser a dimensão tumoral.

#### **6.5.4 MARCADORES X METÁSTASE**

Os estudos publicados em literatura indexada sobre a expressão de biomarcadores em tumores carcinóides, enfocam a correlação dos marcadores com o diagnóstico de variante típica ou atípica, segundo a classificação de Willian Travis<sup>138</sup>.

Não foi esse o objetivo deste estudo, pois o diagnóstico de variante típica não é garantia de que o tumor não tem capacidade de invasão tecidual ou de gerar metástase<sup>149</sup>. A denominação típica não é sinônima de benignidade.

Para que o tumor carcinóide seja realmente benigno, não deve ser detectada invasão de tecidos adjacentes, nem mesmo acometimento metastático linfonodal ou de órgãos à distância no ato operatório, na análise microscópica do espécime cirúrgico ou no seguimento ambulatorial.

Utilizou-se como determinante incontestável da natureza maligna do tumor, a ocorrência de metástase, desde o ato operatório até o quinto ano completo de seguimento ambulatorial especializado. É a primeira vez em literatura indexada, que se propõe o estudo de biomarcadores à luz do fenômeno metastático, e não baseado na classificação de Travis.

#### **6.5.4.1 Bcl-2**

Antes da discussão sobre a comparação do padrão de expressão dos biomarcadores, entre os grupos de doentes sem e com metástase, é imperativo discutir a marcação pelo anticorpo anti Bcl-2.

A proteína citoplasmática Bcl-2 é um monômero de uma estrutura dimérica formada por sua associação ao monômero Bax. Este dímero é funcional. Por isso, o estudo do Bcl-2 sem o Bax é inadequado<sup>90</sup>. A relação entre os dois componentes da estrutura quaternária é que determina se a célula tem maior tendência a entrar em apoptose ou não. A medida isolada da expressão de um dos dois monômeros não é suficiente para concluir qual o fenômeno predominará<sup>55, 84</sup>. Este é o motivo pelo qual foi excluída do índice hipotético de risco para metástase e das análises uni e multivariadas este marcador. A não realização da quantificação da expressão do Bax neste trabalho deu-se por motivos logísticos. Em andamento está o estudo do fenômeno apoptótico em tumores carcinóides típicos, é projeto de tese de doutoramento, e será desenvolvido em conjunto com a Faculdade de Medicina de Mogi das Cruzes, pelo Dr Milton Luis Yaekashi.

#### **6.5.4.2 Ki-67**

A quantificação do índice de expressão imunohistoquímica da proteína nuclear Ki-67 corroborou o conceito de que a taxa proliferativa do tumor carcinóide é diretamente proporcional à sua malignidade. Classicamente,

utiliza-se a classificação de Willian Travis para determinar se o tumor é um carcinóide típico ou atípico. Além da presença de áreas de necrose, a contagem de células em divisão mitótica é considerada um fator determinante de grau de agressividade.

A hipótese inicial de que o índice de expressão IHQ do marcador é maior no grupo de tumores que geram metástase, foi confirmada. A média e o desvio padrão no grupo sem metástase foi de  $1,82 \pm 1,88$ , já no outro grupo foi de  $3,90 \pm 3,11$ , com diferença significativa ( $p=0,005$ ) entre as médias.

A pergunta que surge naturalmente desta observação é: qual o método mais adequado para definir a taxa proliferativa dos tecidos de tumor carcinóide típico? A contagem do número de células em mitose em 10 CGA é um método consagrado, e que não exige colorações especiais. Porém, células que expressam a proteína nuclear Ki-67, nem sempre se apresentam à coloração pelo HE como figuras de mitose. O fenômeno é devido ao fato de células que ainda evoluirão para as fases da mitose detectáveis à microscopia convencional ao HE, já têm seus processos fisiológicos iniciando os passos necessários para a divisão celular. A expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67 é um fenômeno cujo tempo de duração é mais longo que o da apresentação morfológica observada para se considerar a célula em mitose<sup>4</sup>.

#### 6.5.4.3 p53

A proteína p53 em sua forma ativa tem função antineoplásica. A vida média desta molécula selvagem é mais curta que a das formas mutadas e inativas<sup>55</sup>. O aumento da expressão imunohistoquímica do p53 poderia ser decorrente do aumento de produção da proteína ativa ou do aumento do tempo da vida média da estrutura, denotando uma molécula inativa. Na prática, apenas o segundo fenômeno é observado<sup>84, 90</sup>.

A hipótese inicial, de que a perda da função antineoplásica do p53, é detectada mais freqüentemente no grupo de tumores metastáticos foi aceita. A comparação das médias demonstrou que há diferença significativa entre as mesmas ( $p=0,008$ ).

#### 6.5.4.4 CD-34

Comparando-se os tumores que geraram e os que não geraram metástase, o fenômeno que mais apresentou diferença no padrão de apresentação entre os grupos, foi a densidade de microvasos.

Tanto a comparação entre as médias desses dois grupos pelo teste estatístico *t* de Student, como a determinação do coeficiente de risco ( $\beta$ ) para metástase aplicando-se o método de regressão logística para análise multivariada, definiram este marcador como o de maior correlação com a incidência de metástase. A análise multivariada por regressão logística

identificou a variável como a única independente, quando considerada na equação que representa o risco para a ocorrência do fenômeno.

Desde os estudos de Mandriota<sup>105</sup>, foi provado que células neoplásicas bem diferenciadas podem atingir a luz de vasos linfáticos, sobreviver neste ambiente, implantar-se em tecidos à distância, e aí desenvolver colônias tumorais. Também foi estabelecido que o acometimento de órgãos à distância, nestes casos, só é possível na presença de microvasos na intimidade do tumor primário, e que por estes vasos trafegam os êmbolos neoplásicos.

As células do tumor carcinóide típico são bem diferenciadas, e isso levou os pesquisadores a rotulá-las como entidades benignas, sem capacidade de gerar metástase. É estabelecido o fato de que estas células podem gerar êmbolos que têm capacidade de implantação de colônias malignas em tecidos linfonodais ou de outros órgãos<sup>1-3</sup>. Não está definido qual é a característica que lhes confere tal capacidade. Somente estudos que busquem estabelecer relações de causa-efeito, como o citado trabalho pioneiro de Mandriota, poderão mostrar a presença de êmbolos tumorais no interior de estruturas que os levem ao destino de implante. Porém, este trabalho sugere um forte indício que os microvasos marcados pelo CD-34, podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela facilitação do processo de migração das células malignas.

Antes mesmo da conclusão deste estudo, já foi iniciado no grupo, o estudo do fenômeno da angiogênese sangüínea e da linfangiogênese nestes tumores. Pois a impressão que se estabeleceu no decorrer dos trabalhos, foi

a de que a resposta para a questão da malignidade dos tumores carcinóides, pode estar em fenômenos extracelulares, e não na célula neuroendócrina em si.

#### **6.5.4.5 FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS**

A hipótese sugerida ao início dos trabalhos é a de que os tumores envoltos por malhas bem desenvolvidas de fibras extracelulares teriam menor capacidade de atingirem a microcirculação e invadirem tecidos adjacentes<sup>100, 119</sup>. A soma da densidade de fibras elásticas e colágenas foi definida como densidade estromal.

A densidade de fibras, colágenas e elásticas que envolviam os tumores carcinóides que não geraram metástases foi maior que a daqueles que atingiram tecidos linfonodais ou à distância. É corroborado, portanto, o fato de que os fenômenos de desmoplasia e elastose estão relacionados com menor incidência de metástase<sup>1, 102</sup>.

Para que se compreenda melhor qual a correlação entre a densidade de fibras extracelulares e o evento metastático, é indispensável que se estude a farmacodinâmica das enzimas que podem digerir tais estruturas<sup>125</sup>. As células neoplásicas, para progredirem espacialmente pelos tecidos, necessitam que as macromoléculas interpostas entre o tumor e os tecidos vizinhos sejam removidas. A digestão do colágeno e das fibras elásticas é um mecanismo utilizado para tal fim<sup>100</sup>. As enzimas podem ser produzidas pelas próprias células tumorais. Em desenvolvimento pelo acadêmico

Leandro Luongo de Matos, como projeto de iniciação científica, está o estudo das enzimas que têm capacidade de digerir as macromoléculas da matriz extracelular. Foi aceito para exposição como tema livre, no Simpósio Internacional sobre Matriz Extracelular, em setembro de 2004, o trabalho sobre a correlação entre a expressão imunohistoquímica da heparanase e a ocorrência de metástase em tumores carcinóides típicos e atípicos.

A comprovação da produção de enzimas pelas células tumorais, que as proporcionem capacidade de progredirem espacialmente em direção aos microvasos, abrirá um novo leque de pesquisas. A inibição dessas moléculas poderá ser objeto de estudos que visem à tentativa de diminuição do poder de gerar metástases nestes e em outros tumores.

Por enquanto, os dados disponíveis, apontam para uma correlação inversa entre a densidade da malha de fibras que envolvem o tumor e o evento metastático.

#### **6.5.5 MARCADORES X SOBREVIVÊNCIA**

Não foi objetivo do trabalho estudar a correlação entre os marcadores e a taxa de sobrevivência, devido ao número de eventos observado: dois óbitos correlacionados.

#### **6.6 DISCUSSÃO SOBRE O ÍNDICE DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE METÁSTASE**

Um índice de risco, para que tenha aceitação na prática clínica, deve ser facilmente aplicável pelos profissionais que acompanham o doente. O modelo mais aplicado em medicina é o que utiliza a soma de pontos para a obtenção de um valor numérico total que represente o risco em questão<sup>132-134, 136, 137</sup>.

Cada fator somado ao valor final representa a contribuição específica de uma variável correlacionada ao risco.

No caso de variáveis categorizadas, como gênero, grupo étnico, intervenção operatória, administração de uma droga terapêutica, soma-se diretamente um valor referente à contribuição de cada fator para o risco em questão. Porém, no caso de variáveis contínuas, como o índice de expressão imunohistoquímica ou a densidade de fibras extracelulares, existe um coeficiente de risco fixo para cada variável, mas o risco para cada indivíduo oscila com o valor obtido para a variável em questão. Por exemplo, existe um risco específico para cada valor obtido pela contagem de microvasos por CGA tumoral. O risco aumenta proporcionalmente ao aumento da densidade de microvasos como mostrado na figura 17.

A equação que representa o risco de ocorrência de metástase, baseado em variáveis contínuas, é representada pela fórmula:

Risco = constante +  $\Sigma$  coeficiente específico de risco para cada variável x o valor medido para esta variável.

Isso torna o cálculo pouco prático para a aplicação clínica. Por isso, a maioria dos índices numéricos de risco utiliza categorias para cada variável, mesmo que esta seja contínua originalmente. Neste caso, transforma-se a

variável contínua em categorizada. Para cada categoria, determina-se um fator numérico. A soma dos números correspondentes a cada fator resulta no índice<sup>137</sup>.

Com o intuito de discutir o desenvolvimento de um índice de risco para a ocorrência de metástase em pacientes com tumor carcinóide típico broncopulmonar, descreve-se separadamente um índice real baseado na análise multivariada por regressão logística e um índice proposto simplificado.

#### **6.6.1 ÍNDICE DE RISCO COM BASE NA ANÁLISE MULTIVARIADA**

Um índice numérico de risco baseado nesta casuística, para ter validade externa e poder ser aplicado aos pacientes com tumor carcinóide típico não inclusos neste estudo, deve ser fundamentado na análise de todas as variáveis de forma conjunta. O método para tal análise é a regressão logística multivariada, tendo-se como evento a ser estudado, a ocorrência ou não de metástase (evento binário).

A aplicação do teste, levando-se em conta as variáveis gênero e marcadores, tem como resultado que a densidade de microvasos é a variável que se correlaciona de forma independente com a ocorrência de metástase. O coeficiente de risco é  $\beta = 0,3$ , com erro padrão de 0,1, e significância de  $p=0,0001$ . A constante para a equação de risco é de -5,2, e representa o risco de metástase para o caso de a densidade de microvasos tender a zero. O valor real da constante, para que tenha significado

biológico, deve ser considerado zero, pois não há sentido na representação de um risco por meio de um valor negativo.

A utilidade destes dados na prática clínica é pouco provável, pois para um determinado doente, dever-se-ia mensurar a densidade de microvasos (dmv) e aplicar o valor na seguinte fórmula:

Risco de metástase =  $-5,244 + [\text{dmv} / (1 + e^{-0,321})]$ , onde "e" é a constante de Neper.

A fórmula determina o risco para cada valor e é representada pela Figura 17.

É natural que não se aplique no cotidiano um índice baseado em cálculos como os acima descritos.

A causa da identificação da densidade de microvasos como única variável independente é explicada pelo número de eventos ocorridos: 13 eventos (metástase linfonodal ou à distância). Com o aumento da população estudada, o número de casos sem e com metástase será suficiente para conferir poder estatístico aos testes, e talvez implicar os outros marcadores como variáveis independentes correlacionadas ao risco.

A crítica à análise multivariada em relação à univariada, neste estudo, é a interpretação dos coeficientes de risco para o evento metastático definidos pela primeira análise. Como explicar que uma variável, que pela análise univariada, como a densidade de fibras elásticas, tem correlação com a ocorrência de metástase, com diferença entre as médias dos dois grupos aceita com significância de  $p=0,001$ , passe a não ter mais correlação quando analisada em conjunto com a densidade de microvasos?

Não há como decretar a relação entre a elastose e a angiogênese como fenômeno real. Se a fisiologia tumoral determinar de forma independente que os dois fatores ocorram, e que não há relação causal entre os mesmos, não há porque considerar somente um deles como relacionado ao evento metastático.

O estudo dos biomarcadores descritos neste trabalho continua sendo realizado e, atualmente, a população estudada pelo grupo é de 143 pacientes. A aplicação dos testes estatísticos em populações maiores poderá resgatar como variáveis independentes outros marcadores, sejam dos incluídos neste trabalho, sejam dos novos que estão sendo estudados.

Até que se concluam os novos trabalhos, não há como determinar um índice de risco baseado na análise multivariada por regressão logística. Discute-se, então, um modelo que poderá ser desenvolvido caso os marcadores que se mostraram relacionados com o risco de metástase pela análise univariada, confirmem-se como variáveis independentes na multivariada.

#### **6.6.2 ÍNDICE DE RISCO: PROPOSTA DE UM MODELO SIMPLIFICADO**

Um índice numérico diretamente proporcional ao risco da ocorrência de metástase aplicável à prática clínica pode ser desenvolvido.

Para que seja aceito, deve ser facilmente calculado, sem que seja necessário a aplicação de fórmulas matemáticas pouco condizentes com o cotidiano do clínico ou do cirurgião. Pode-se citar a escala numérica de

Glasgow para medir a o nível de consciência de um indivíduo, amplamente aplicada em pacientes vítimas de neurotrauma. Sua aplicação é tão simples, que se pode calcular o índice durante o atendimento inicial na sala de urgência, ou mesmo ao resgatar-se o paciente no local do trauma<sup>132</sup>.

Outros exemplos, como os índices numéricos de risco operatório<sup>134</sup> ou prognóstico para pacientes com carcinomas pulmonares não pequenas células inoperável, são facilmente aplicáveis. Em todos os casos citados, as variáveis avaliadas são categóricas. Para cada tipo de variável, soma-se um valor definido.

Como um exemplo deste tipo de índice, tem-se o utilizado para pacientes com carcinoma pulmonar: Índice Prognóstico para Pacientes com Carcinoma Pulmonar Não Pequenas Células Irressecável<sup>137</sup>, desenvolvido na Finlândia por Tuija Wigren, em 1997.

O índice baseia-se em 5 variáveis categorizadas: sintomas, estadio, *performance status*, taxa de hemoglobina sérica e maior diâmetro do tumor. Para cada variável, soma-se zero ou 1 ponto. Considera-se 1 ponto a observação de: presença de sintomas, estadio III ou IV, *performance status* (índice de Karnofsky) abaixo de 70, taxa de hemoglobina sérica abaixo de 125 g/l e diâmetro do tumor acima de 7 cm. A soma varia de zero a cinco.

Os 5 critérios foram escolhidos após a análise de 19 itens pela análise univariada. Os 5 que tiveram correlação com o prognóstico foram selecionados. Cada variável foi categorizada em dois grupos, arbitrariamente. As contínuas, como acima ou abaixo da média, as já categóricas, agrupadas em duas categorias. Analisou-se em conjunto as 5

variáveis através da análise multivariada. Definiu-se o risco relativo para cada variável. Por serem todos os 5 valores muito parecidos (de 1,35 a 1,44), decidiu-se por somar-se o valor 1 para a presença de cada fator de risco apresentado pelo doente.

Se aplicarmos o mesmo método levando-se em conta as variáveis clínicas e biomarcadores que tiveram relação com o fenômeno metastático pela análise univariada, pode-se construir um índice numérico parecido. O método utilizado está descrito no item 4.2.6.2.

Este modelo simplificado não pode ser aplicado a indivíduos de outras casuísticas, pois não tem validade externa. Como já discutido, somente estudos envolvendo mais casos podem definir outros marcadores além do CD-34 como variável independente. Porém, como modelo a ser desenvolvido, e tendo validade interna, consegue determinar três grupos de risco: baixo, intermediário e alto.

A fácil aplicação do índice, somando-se pontos de forma binária para cada variável: zero ou o valor da razão de chances específica, faz com que possa ser utilizado na prática clínica.

A escolha da razão de chances como medida de risco, foi decorrente do desenho do estudo. Para a divisão dos doentes em categorias acima e abaixo da média, utilizaram-se valores obtidos retrospectivamente. Não se pode considerar três coortes de seguimento (baixo, médio e alto risco), e conseqüentemente, é inadequado utilizar medidas como risco relativo ou risco atribuído<sup>161</sup>.

Entre os 15 pacientes do grupo de baixo risco para a ocorrência de metástase, a incidência do fenômeno foi zero. Entre os 16 do grupo de alto risco, a incidência foi de 62% (10/16).

Apesar de não ter sido possível estabelecer um índice real de fácil aplicação, propôs-se um modelo, que só poderá ser aceito ou rejeitado, após a inclusão de mais pacientes no estudo, ou a inclusão de marcadores com maior coeficiente de risco à análise multivariada por regressão logística.

## **6.7 PERSPECTIVAS**

O ambulatório especializado para o seguimento de pacientes tratados de tumores neuroendócrinos está em pleno funcionamento, com mais de 200 doentes cadastrados, alguns seguidos a mais de 20 anos.

Profissionais de diversas áreas, como clínicos, cirurgiões, patologistas, radiologistas e pesquisadores desenvolvem atividades de assistência e pesquisa, juntamente com os acadêmicos. Os laboratórios de patologia da FMUSP, Escola Paulista de Medicina da UNIFESP e da Faculdade de Medicina do ABC desenvolvem pesquisas ligadas ao grupo.

Nos últimos anos, trabalhos realizados são aceitos e discutidos em congressos nacionais e internacionais<sup>162, 163</sup>. Duas teses de doutoramento e dois projetos de iniciação científica foram concluídos, assim como mais dois pós-graduandos e um acadêmico já estão matriculados no programa.

Iniciou-se a linha de pesquisa em carcinóides que estuda material genético, sob a supervisão do Dr. Alexandre Muxfeldt Ab'Saber e Dra. Estela

Novak; assim como os trabalhos que estudam características que auxiliarão na terapia com microrradioterapia, bloqueadores de angiogênese e análogos de somatostatina, estão em fase de conclusão pelo Dr. Fernando Moura. Enfim, todos os componentes para que se compreenda o funcionamento das células destes tumores estão reunidos. É uma questão de tempo, e pouco tempo, para que a conclusão de novos trabalhos com suas respostas e muitas novas dúvidas, tragam à luz formas mais completas de diagnóstico e tratamento.

Os pacientes seguidos e os que virão a ser acompanhados terão a seu dispor toda uma estrutura dinâmica, que busca oferecer o diagnóstico e o tratamento atualizado, baseados nas contínuas descobertas.

Os doentes que apresentam variantes menos agressivas, e talvez nem mesmo neoplásicas, poderão receber o diagnóstico bem definido de possuírem uma doença benigna. Aqueles que vierem a serem acometidos por neoplasia invasiva e com potencial metastático, não serão privados de um tratamento condizente com a gravidade do seu quadro.

Nenhuma dificuldade sobrevive ao trabalho perseverante, e o grupo prossegue com suas atividades, na certeza de um porvir com consistentes progressos.

Em um futuro próximo, esta tese servirá como uma singela referência histórica ante às promissoras respostas, que com certeza virão; e para os pacientes, será motivo para uma agradável conversa, sobre curiosidades do tempo em que se chamava todos estes tumores de “carcinóide”.

## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com o exposto, conclui-se que:

1. Existe correlação entre a incidência de metástases e o nível de expressão de cada biomarcador tecidual estudado.
2. Existe correlação entre a incidência de metástase e:
  - gênero;
  - margem cirúrgica comprometida por neoplasia.
3. Não existe correlação entre a incidência de metástase e:
  - localização da lesão (central ou periférica);
  - maior diâmetro tumoral;
  - estadio TNM.

A idade relacionou-se de forma marginal com o fenômeno, porém não houve significância estatística.

4. Não foi possível estabelecer um índice numérico, com validade externa à casuística, que represente o risco da ocorrência de metástase. Porém, propôs-se um modelo de índice a ser desenvolvido.

## **8. ANEXOS**

---

## 8.1 ANEXO A

Tabela A1– Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes incluídos no estudo

n	Gênero	Idade	Local	Op	Sobrev (meses)	Status	Central Perif	Margem	T	Maior Diâmetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )	N	qtd linfs posit	total linfs dissec	M	EST
1	m	34	binter	3	270	1	C	0	1	20,00	4188,79	0	0	1	1	IA
2	f	19	LSD	2	269	1	C	0	1	15,00	1436,75	0	0	0	0	IA
3	m	45	bpD	5	156	1	C	0	3	20,00	4188,79	0	0	0	0	IIB
4	f	18	bpD	4	0	0	C	0	3	30,00	14137,17	1	1	20	0	IIIA
5	f	41	LM	2	247	1	P	0	1	18,00	1696,46	0	0	3	0	IA
6	f	25	LM	2	220	1	C	0	1	20,00	4188,79	0	0	3	0	IA
7	m	62	LIE	2	168	0	C	0	2	30,00	14137,17	0	0	12	0	IB
8	f	39	LM	3	230	1	C	0	2	35,00	11108,67	0	0	5	0	IB
9	f	29	LSD	2	231	1	C	0	1	20,00	4188,79	0	0	0	0	IA
10	f	43	LSE	2	224	1	C	0	1	20,00	251,33	0	0	5	0	IA
11	m	56	LSE	1	214	1	P	0	2	30,00	14137,17	0	0	0	0	IB
12	f	38	bpE	5	212	1	C	0	1	15,00	1436,75	0	0	12	0	IA
13	m	17	LIE	2	208	1	C	0	2	18,00	3053,63	0	0	12	0	IB
14	m	42	LSE	2	173	1	C	0	1	30,00	14137,17	2	2	10	0	IIIA
15	f	42	LM	2	90	1	C	1	1	20,00	1047,20	0	0	5	1	IA
16	f	27	LID	2	167	1	C	0	2	35,00	20579,52	0	0	0	0	IB
17	f	46	LM	4	163	1	C	0	2	50,00	65449,85	0	0	4	0	IB
18	m	51	bpE	4	12	0	C	0	3	70,00	62308,25	2	3	3	1	IV
19	f	62	bpE	4	159	1	C	0	3	70,00	179594,38	0	0	9	0	IIB
20	m	47	LID	2	3	0	P	0	2	40,00	33510,32	0	0	0	1	IB
21	m	53	LSD	2	166	1	C	1	2	45,00	20734,51	0	0	0	1	IB
22	f	30	LID	2	166	1	C	0	2	40,00	33510,32	0	0	0	0	IB
23	m	37	LSE	5	163	1	C	1	1	9,00	268,08	0	0	3	0	IA
24	f	57	LID	2	160	1	C	0	1	9,00	134,04	0	0	5	0	IA
25	f	58	LSD	2	155	1	P	0	2	45,00	20734,51	0	0	1	0	IB
26	m	63	LIE	2	153	1	C	0	2	40,00	33510,32	0	0	1	0	IB
27	f	27	LSE	2	153	1	C	1	1	20,00	4188,79	0	0	0	0	IA
28	m	64	LSE	2	151	1	C	1	1	20,00	2932,15	0	0	2	0	IA
29	f	33	LM	2	147	1	C	0	1	20,00	4188,79	0	0	1	0	IA
30	f	9	LIE	2	146	1	C	1	2	30,00	4712,39	0	0	3	0	IB
31	f	69	LSE	2	143	1	P	0	1	5,00	33,51	2	2	14	0	IIIA
32	f	14	bpE	5	155	1	C	0	2	50,00	26179,93	0	0	9	0	IB
33	f	24	LID	2	163	1	C	0	1	25,00	3870,44	2	2	10	0	IIIA
34	m	66	LIE	4	114	1	C	0	2	70,00	179594,38	2	3	10	0	IIIA
35	m	66	LID	2	149	1	C	0	2	60,00	113097,33	0	0	4	0	IB
36	f	20	LM	3	130	1	C	0	2	30,00	6283,18	0	0	5	0	IB
37	f	49	LID	2	60	1	C	0	2	30,00	6283,18	0	0	4	0	IB
38	f	28	bpE	4	120	1	C	0	3	40,00	33510,32	0	0	4	0	IIB
39	m	29	LM	2	119	1	C	0	1	10,00	83,77	0	0	3	0	IA
40	f	42	bpE	4	119	1	C	0	3	20,00	4188,79	0	0	5	0	IIB
41	f	32	LID	4	107	1	C	0	3	42,00	38792,39	0	0	7	0	IIB
42	f	37	binter	3	111	1	C	0	2	45,00	6450,74	0	0	3	0	IB
43	f	54	bpD	4	103	1	C	0	3	65,00	100530,96	0	0	25	0	IIB
44	m	37	LSD	2	230	1	P	0	2	30,00	9424,78	0	0	8	0	IB
45	f	30	LSE	2	155	1	C	0	1	15,00	1436,75	0	0	1	0	IA
46	m	32	bpE	4	99	1	C	1	1	10,00	523,60	1	1	17	0	IIA
47	m	20	bpE	2	94	1	C	0	1	17,00	2144,66	0	0	1	0	IA
48	m	29	LSD	2	98	1	P	0	1	20,00	502,65	0	0	5	0	IA
49	f	35	LSD	2	82	1	C	1	1	15,00	733,04	0	0	3	0	IA
50	m	77	LM	2	77	1	C	0	2	40,00	22787,02	0	0	2	0	IB
51	m	45	LSD	2	77	1	C	0	2	30,00	3078,76	2	1	16	0	IIIA
52	m	46	bpE	5	18	0	C	1	3	20,00	4188,79	2	2	4	1	IIB
53	m	48	LIE	2	68	1	C	0	1	5,00	33,51	0	0	5	0	IA
54	f	24	bpE	4	67	1	C	0	3	10,00	335,10	0	0	11	0	IIB
55	f	24	LIE	2	64	1	P	0	2	35,00	20579,52	0	0	2	0	IB

LEGENDA: Gênero: m=masculino, f=feminino.

Local: b = brônquio, inter = intermédio, L = lobo, S = superior, I = inferior, M = médio  
D = direito, E = esquerdo, bp = brônquio principal

Op = tipo de operação: 1 = segmentectomia, 2 = lobectomia,  
3 = bilobectomia, 4 = pneumonectomia, 5 = broncoplastia.

Status: 1 = vivo, 0 = óbito.

Margem: 1 = comprometida.

\* NOTA: M inclui metástase diagnosticada no decorrer do acompanhamento.

## 8.2 ANEXO B

Tabela B1 – Quantificação dos marcadores estudados

n	Bcl-2	Ki-67	p53	CD-34	Colágeno	Elástica	Densidade Estromal (microm <sup>2</sup> )
1	7,90	0,00	1,80	4,20	5,94	13,60	19,54
2	8,20	0,00	0,00	2,60	5,22	13,86	19,13
3	0,00	3,90	0,00	14,80	0,06	3,49	3,55
4	8,20	0,00	0,00	21,00	2,27	5,31	7,58
5	9,10	0,00	0,00	5,60	23,58	13,60	37,18
6	10,00	0,00	0,00	2,70	14,42	15,38	29,80
7	10,00	0,00	0,00	6,80	14,57	16,66	31,23
8	12,30	5,90	5,60	18,20	2,45	7,21	9,66
9	13,40	5,40	6,40	3,90	16,14	13,60	29,74
10	0,00	5,20	5,90	6,70	14,42	11,17	25,59
11	0,00	4,90	6,70	14,60	7,84	6,75	14,59
12	13,80	5,00	2,00	15,00	1,57	6,65	8,22
13	14,90	5,60	2,00	6,00	23,58	11,17	34,75
14	15,20	6,40	2,00	16,70	2,27	9,40	11,67
15	0,00	5,30	6,80	15,80	4,55	6,75	11,30
16	0,00	5,30	7,20	14,90	2,46	7,84	10,30
17	2,13	3,00	4,30	4,80	14,61	15,38	29,99
18	6,13	1,11	3,20	5,60	7,42	13,60	22,14
19	12,30	0,90	2,00	5,90	14,90	13,80	28,70
20	13,40	7,20	2,00	4,01	0,06	9,31	17,40
21	17,68	0,02	1,99	5,03	14,90	14,90	29,80
22	16,78	2,10	1,80	3,49	14,70	16,60	31,30
23	15,46	1,90	2,70	2,99	16,14	18,17	34,31
24	13,22	1,67	2,33	3,78	19,30	18,00	37,30
25	11,90	0,00	2,90	5,23	19,30	18,40	37,70
26	10,00	0,00	2,70	6,21	27,47	13,60	41,07
27	11,23	0,00	2,10	7,54	15,30	18,17	33,47
28	15,00	0,00	0,00	8,21	13,80	15,38	29,18
29	12,33	0,00	0,00	9,22	10,60	16,66	37,86
30	10,90	1,80	0,00	2,34	13,00	18,17	31,17
31	2,11	7,66	4,56	15,80	1,70	2,96	4,66
32	9,80	1,90	0,00	7,50	9,00	19,50	28,50
33	3,20	6,23	6,54	21,09	3,22	3,26	6,48
34	1,11	5,99	5,78	19,70	4,48	3,49	7,97
35	19,00	0,00	0,00	2,89	9,69	18,17	27,86
36	9,78	3,00	0,00	7,33	10,60	15,38	25,98
37	8,87	2,00	1,02	7,56	11,50	18,17	29,67
38	7,49	1,00	2,00	8,03	11,50	16,66	28,16
39	7,89	1,00	2,00	9,04	11,57	11,17	22,74
40	7,70	1,00	0,00	9,00	14,42	11,00	25,12
41	5,90	1,00	0,00	8,99	10,60	7,87	18,47
42	12,00	0,00	0,00	7,40	4,55	15,38	19,93
43	9,00	1,99	1,55	6,90	14,70	13,60	28,30
44	8,90	0,00	2,00	2,89	14,42	18,17	35,59
45	7,60	0,00	1,78	2,31	18,44	18,50	36,94
46	3,10	5,34	7,23	18,76	1,26	4,05	5,31
47	7,90	0,00	0,10	9,00	11,50	18,00	29,50
48	8,60	1,00	1,00	3,45	19,10	16,66	35,76
49	9,50	2,00	2,00	3,88	18,44	13,60	32,04
50	8,90	2,00	0,00	4,78	15,50	18,00	33,50
51	2,40	5,40	5,87	19,60	19,50	18,17	37,67
52	3,60	0,00	0,00	6,80	10,20	15,38	29,60
53	12,40	2,00	1,00	6,00	8,97	18,17	27,14
54	11,90	2,00	2,00	3,99	5,54	18,50	24,04
55	10,70	2,00	2,00	3,87	6,68	16,60	23,28

## 8.3 ANEXO C

**Tabela C1 – Médias, desvios-padrão, valores mínimos e máximos da expressão de cada marcador e número de casos que não apresentaram marcação**

<b>Marcador</b>	<b>Média ± dp*</b>	<b>Mínimo-máximo</b>	<b>Negativos (%)</b>
<b>Ki-67</b>	2,31 ± 2,37	0,00 - 7,66	17 (30,9)
<b>p53</b>	2,23 ± 2,29	0,00 - 7,23	17 (30,9)
<b>Bcl2</b>	8,92 ± 4,88	0,00 - 19,00	5 (9,1)
<b>CD34</b>	8,37 ± 5,51	2,31 - 21,09	-
<b>Fibras colágenas</b>	11,09 ± 6,59	0,06 - 27,47	-
<b>Fibras elásticas</b>	13,33 ± 4,90	2,96 - 19,50	-
<b>Densidade estromal</b>	24,90 ± 10,32	3,55 - 41,07	-

\*desvio-padrão.

## 8.4 ANEXO D

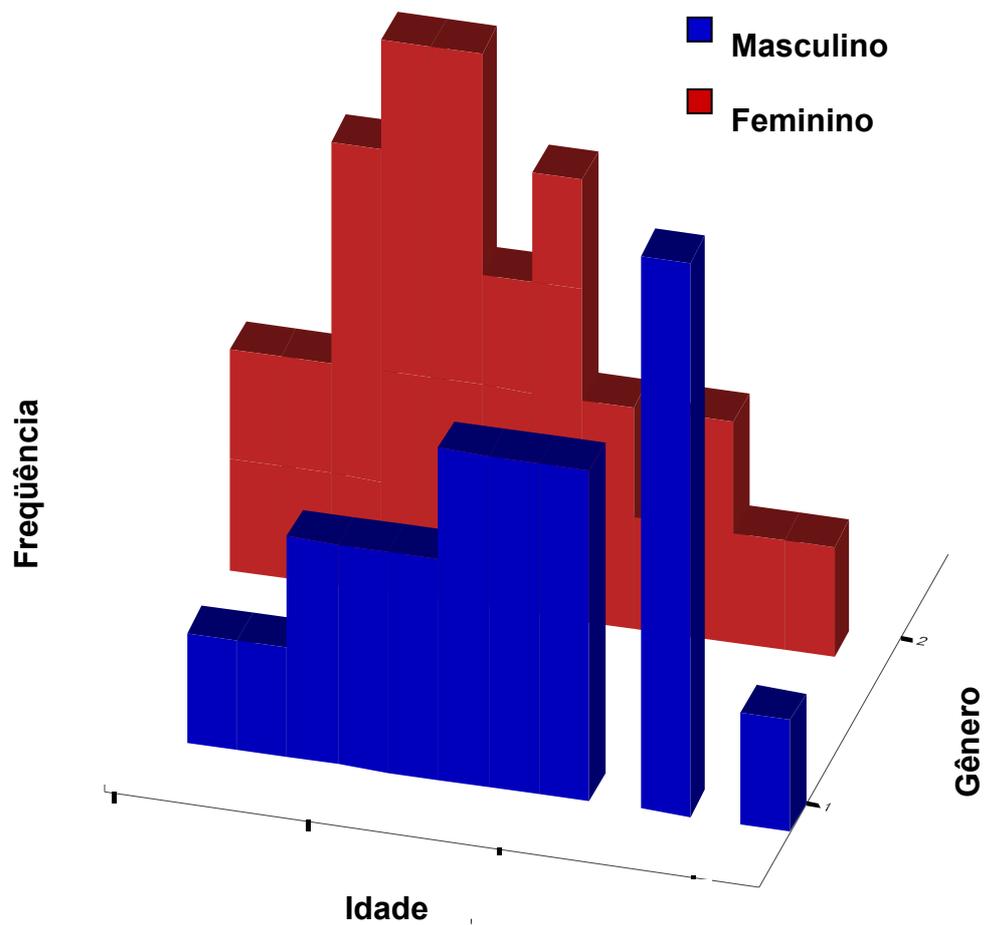
Tabela D1 – Correlação entre os índices de expressão dos marcadores entre si

Marcador	Coeficiente de Correlação de Pearson						
	Ki-67	p53	Bcl2	CD34	FC	FE	DE
<b>Ki-67</b>		0,70	-0,34	0,58	-0,44	-0,64	-0,59
<b>p53</b>	0,70		-0,48	-0,50	-0,20*	-0,48	-0,38
<b>Bcl2</b>	-0,34	-0,48		-0,49	0,27	0,49	0,42
<b>CD34</b>	0,58	-0,50	-0,49		-0,54	-0,75	-0,72
<b>FC</b>	-0,44	-0,20*	0,27	-0,54		0,59	0,89
<b>FE</b>	-0,64	-0,48	0,49	-0,75	0,59		0,86
<b>DE</b>	-0,59	-0,38	0,42	-0,72	0,89	0,86	

\* p&gt;0,05.

## 8.5 ANEXO E

Figura E 1 – Distribuição das idades de cada indivíduo por gênero.



## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol Annu.* 1983;18 Pt 1:287-330.
2. Mills SE, Cooper PH, Walker AN, Kron IL. Atypical carcinoid tumor of the lung. A clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Surg Pathol.* 1982;6(7):643-54.
3. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972;64(3):413-21.
4. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de imuno-histoquímica.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
5. Oberndorfer S. Karzinoid Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol.* 1907;1:425-28.
6. Creutzfeldt W. Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg.* 1996;20(2):126-31.
7. Feyrter F. [On the distinguishing features between bronchial carcinoid and bronchial muciparous adenoma]. *Frankf Z Pathol.* 1959;69:659-66.
8. Tani EM, Moraes HP, Bacchi CE. Tumores do pulmão: estudo cito-histológico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico de 16 casos. *J Pneumol.* 1986;12(4):222-28.

9. Harpole DH, Jr., Feldman JM, Buchanan S, Young WG, Wolfe WG. Bronchial carcinoid tumors: a retrospective analysis of 126 patients. *Ann Thorac Surg.* 1992;54(1):50-4; discussion 54-5.
10. Vadasz P, Palffy G, Egervary M, Schaff Z. Diagnosis and treatment of bronchial carcinoid tumors: clinical and pathological review of 120 operated patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7(1):8-11.
11. Skuladottir H, Hirsch FR, Hansen HH, Olsen JH. Pulmonary neuroendocrine tumors: incidence and prognosis of histological subtypes. A population-based study in Denmark. *Lung Cancer.* 2002;37(2):127-35.
12. Berge T, Linell F. Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period. *Acta Pathol Microbiol Scand [A].* 1976;84(4):322-30.
13. Huang Q, Muzitansky A, Mark EJ. Pulmonary neuroendocrine carcinomas. A review of 234 cases and a statistical analysis of 50 cases treated at one institution using a simple clinicopathologic classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(5):545-53.
14. Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L, et al. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(5):1781-5.
15. Gould PM, Bonner JA, Sawyer TE, Deschamps C, Lange CM, Li H. Bronchial carcinoid tumors: importance of prognostic factors that influence patterns of recurrence and overall survival. *Radiology.* 1998;208(1):181-5.
16. Coelho Filho JC, Bandeira AC, Alves VAF. Tumores carcinóides de pulmão - estudo comparativo entre as variantes clássica e atípica com

- ênfase ao seguimento clínico e aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos. *J pneumol.* 1988;14(3):127-32.
17. Bensch KG, Gordon GB, Miller LR. Electron Microscopic and Biochemical Studies on the Bronchial Carcinoid Tumor. *Cancer.* 1965;18:592-602.
18. Hage E. Histochemistry and fine structure of bronchial carcinoid tumours. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat.* 1973;361(2):121-8.
19. Paladugu RR, Benfield JR, Pak HY, Ross RK, Teplitz RL. Bronchopulmonary Kulchitzky cell carcinomas. A new classification scheme for typical and atypical carcinoids. *Cancer.* 1985;55(6):1303-11.
20. Taylor W. Pulmonary argyrophil cells at high altitude. *J Pathol.* 1977;122(3):137-44.
21. Froelich F. Die "helle-zelle" der bronchialshlenhaut und ihre beziehungen zum problem der chemorezeptoren. *Frankf Z Pathol.* 1949;60:517-22.
22. Lawuveryns JM, Peuskens JC. Neuroepithelial bodies (neuroepithelial organ?) in human infant bronchial and bronchiolar epithelium. *Anat Rec.* 1972;172:471-76.
23. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest.* 1983;49(5):519-37.
24. Reznik-Schüller H. Proliferation of endocrine (APUD-type) cells during early N-diethylnitrosamine-induced lung carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* 1976;1:255-59.

25. Reznik-Schüller H. Ultrastructural alterations of APUD cells during nitrosamine-induced lung carcinogenesis. *J Pathol.* 1977;121:79-83.
26. Wang JC, Shi DR, Fu XL, Lu WP, Shi FJ, Lu CL. [Analysis of clinicopathologic features and morphogenesis of carcinoid tumorlets in the lung with bronchiectasis]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2003;32(4):350-3.
27. Grote TH, Macon WR, Davis B, Greco FA, Johnson DH. Atypical carcinoid of the lung. A distinct clinicopathologic entity. *Chest.* 1988;93(2):370-5.
28. Ab'Saber AM. *Relevância clínica dos carcinomas de grandes células pulmonares com relação às características neuroendócrinas, biomoleculares e estromais* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.
29. Lin O, Olgac S, Green I, Zakowski MF, Klimstra DS. Immunohistochemical staining of cytologic smears with MIB-1 helps distinguish low-grade from high-grade neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(2):209-16.
30. Queiroz AC. Quimiodectomas microscópicos do pulmão. *Acta Med Port.* 1979;1:689-95.
31. Onuki N, Wistuba, II, Travis WD, Virmani AK, Yashima K, Brambilla E, et al. Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Cancer.* 1999;85(3):600-7.
32. Tsioulis G, Muto T, Kubota Y, Masaki T, Suzuki K, Akasu T, et al. DNA ploidy pattern in rectal carcinoid tumors. *Dis Colon Rectum.* 1991;34(1):31-6.

33. Padberg BC, Woenckhaus J, Hilger G, Beccu L, Jochum W, Range U, et al. DNA cytophotometry and prognosis in typical and atypical bronchopulmonary carcinoids. A clinicomorphologic study of 100 neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(7):815-22.
34. Laënnec R. *De l'auscultation médiate ou traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur: fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration*. 3rd ed. Paris: Chaudé; 1831.
35. Lubarsch O. Über den primären krebs des ileum, nebst bemerkungen über das gleichzeitige vorkommen von krebs und tuberculose. *Virchows Arch*. 1888;111:280-370.
36. Warren WH, Gould VE, Faber LP, Kittle CF, Memoli VA. Neuroendocrine neoplasms of the bronchopulmonary tract. A classification of the spectrum of carcinoid to small cell carcinoma and intervening variants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985;89(6):819-25.
37. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of lung and pleural tumours; 1999.
38. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Histological typing of lung tumors. *Am J Clin Pathol*. 1982;77:123-36.
39. Travis WD, Gal AA, Colby TV, Klimstra DS, Falk R, Koss MN. Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. *Hum Pathol*. 1998;29(3):272-9.
40. Mentzer SJ, Myers DW, Sugarbaker DJ. Sleeve lobectomy, segmentectomy, and thoracoscopy in the management of carcinoma of the lung. *Chest*. 1993;103(4 Suppl):415S-417S.

41. Cooper DK, Belcher JR. Conservative surgery for bronchial adenomata. *Thorax*. 1976;31(1):44-8.
42. Stamatis G, Freitag L, Greschuchna D. Limited and radical resection for tracheal and bronchopulmonary carcinoid tumour. Report on 227 cases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1990;4(10):527-32; discussion 533.
43. Marty-Ane CH, Costes V, Pujol JL, Alauzen M, Baldet P, Mary H. Carcinoid tumors of the lung: do atypical features require aggressive management? *Ann Thorac Surg*. 1995;59(1):78-83.
44. Ximenes Netto M, Martinelli JG. Adenoma Brônquico. *Rev Bras Cir*. 1972;62:13-6.
45. Schrevens L, Vansteenkiste J, Deneffe G, De Leyn P, Verbeken E, Vandenberghe T, et al. Clinical-radiological presentation and outcome of surgically treated pulmonary carcinoid tumours: a long-term single institution experience. *Lung Cancer*. 2004;43(1):39-45.
46. Filosso PL, Ruffini E, Oliaro A, Papalia E, Donati G, Rena O. Long-term survival of atypical bronchial carcinoids with liver metastases, treated with octreotide. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002;21(5):913-7.
47. Torre M, Barberis M, Barbieri B, Bonacina E, Belloni P. Typical and atypical bronchial carcinoids. *Respir Med*. 1989;83(4):305-8.
48. Okike N, Bernatz PE, Woolner LB. Carcinoid tumors of the lung. *Ann Thorac Surg*. 1976;22(3):270-7.
49. Rea F, Binda R, Spreafico G, Calabro F, Bonavina L, Cipriani A, et al. Bronchial carcinoids: a review of 60 patients. *Ann Thorac Surg*. 1989;47(3):412-4.

50. Silva NA, Bruno C, Arra A, D'Angelo M, Sallis N, Di Bartolo G, et al. Tumor carcinoide de pulmón: conducta terapéutica. *Rev Argent Cir.* 1988;54(5):158-66.
51. Valli M, Fabris GA, Dewar A, Hornall D, Sheppard MN. Atypical carcinoid tumour of the lung: a study of 33 cases with prognostic features. *Histopathology.* 1994;24(4):363-9.
52. Jiang SX, Kameya T, Shoji M, Dobashi Y, Shinada J, Yoshimura H. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a histologic and immunohistochemical study of 22 cases. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(5):526-37.
53. Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch.* 1995;425(6):547-60.
54. Dusmet ME, McKneally MF. Pulmonary and thymic carcinoid tumors. *World J Surg.* 1996;20(2):189-95.
55. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V, et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer.* 1998;34(5):718-23.
56. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton PS, Travis WD, et al. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol.* 2003;34(2):136-42.
57. Lloyd RV. Utility of Ki-67 as a prognostic marker in pancreatic endocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 1998;109(3):245-7.

58. Battlehner CN, Saldiva PH, Carvalho CR, Takagaki TY, Montes GS, Younes RN, et al. Nuclear/cytoplasmic ratio correlates strongly with survival in non-disseminated neuroendocrine carcinoma of the lung. *Histopathology*. 1993;22(1):31-4.
59. Soga J, Tazawa K. Pathologic analysis of carcinoids. Histologic reevaluation of 62 cases. *Cancer*. 1971;28(4):990-8.
60. Ximenes Netto M. Recentes avanços em câncer do pulmão. *HFA - Publi Tec Cient*. 1987;2(1):65-77.
61. Seregni E, Botti C, Bogni A, Bombardieri E. Tumour marker evaluation in patients with lung cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1995;221:67-71.
62. Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, Tateishi M, Sugio K, Sugimachi K. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res*. 1993;53(20):5000-3.
63. Demarchi LM, Reis MM, Palomino SA, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, et al. Prognostic values of stromal proportion and PCNA, Ki-67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2000;13(5):511-20.
64. Kawamata H, Kameyama S, Kawai K, Tanaka Y, Nan L, Barch DH, et al. Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *Int J Cancer*. 1995;63(4):568-75.
65. McCaughan BC, Martini N, Bains MS. Bronchial carcinoids. Review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985;89(1):8-17.

66. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol*. 1997;15(8):2858-65.
67. Carvalho PE, Antonangelo L, Bernardi FD, Leao LE, Rodrigues OR, Capelozzi VL. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2000;30(11):478-86.
68. Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, et al. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(8):934-44.
69. Gentil Perret A, Mosnier JF, Buono JP, Berthelot P, Chipponi J, Balique JG, et al. The relationship between MIB-1 proliferation index and outcome in pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol*. 1998;109(3):286-93.
70. Campos KN, Ximenes Netto M, Silva RO, Freitas LAM, Berger R, Vieira LF, et al. Taxas de crescimento como fator prognóstico no câncer de pulmão. *J Pneumol*. 1987;13(2):59-65.
71. Shah R, Sabanathan S, Mearns J, Richardson J, Goulden C. Carcinoid tumour of the lung. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1997;38(2):187-9.
72. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710-5.

73. Crotti PLR. *Valor prognóstico de marcadores tumorais imunohistoquímicos, morfometria e regiões organizadoras de nucléolos (NORs) na sobrevida de pacientes com tumor carcinóide pulmonar* [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 1996.
74. Matheus RS. *Relevância de parâmetros morfológicos e biológicos ("star volume", índice mitótico, AgNOR e Ki67) em carcinoma pulmonar dos tipos histológicos de células não pequenas e suas metástases hematogênicas*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 2000.
75. Arbiser ZK, Arbiser JL, Cohen C, Gal AA. Neuroendocrine lung tumors: grade correlates with proliferation but not angiogenesis. *Mod Pathol*. 2001;14(12):1195-9.
76. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
77. 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;342(6250):705-8.
78. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene*. 1990;5(10):1603-10.
79. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro JY, Lee JJ, Tu N, et al. Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol*. 1995;13(8):1893-903.

80. McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, Harris A, Lane D, Gatter KC. The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer*. 1992;66(4):735-8.
81. Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrini S, Pepe S, et al. p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res*. 1993;53(12):2846-51.
82. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992;70(6):923-35.
83. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi S, Rusch V, Nowak JA, et al. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. A preliminary report of LCSG 871. *Chest*. 1994;106(6 Suppl):377S-381S.
84. Zaffaroni N, De Polo D, Villa R, Della Porta C, Collini P, Fabbri A, et al. Differential expression of telomerase activity in neuroendocrine lung tumours: correlation with gene product immunophenotyping. *J Pathol*. 2003;201(1):127-33.
85. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9(4):138-41.
86. Top B, Mooi WJ, Klaver SG, Boerrigter L, Wisman P, Elbers HR, et al. Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 1995;64(2):83-91.

87. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res.* 1992;52(17):4828-31.
88. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic bases of disease.* 4th ed. Boston: W B Saunders Company; 1989.
89. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* 1998;14(10):410-6.
90. Kobayashi Y, Tokuchi Y, Hashimoto T, Hayashi M, Nishimura H, Ishikawa Y, et al. Molecular markers for reinforcement of histological subclassification of neuroendocrine lung tumors. *Cancer Sci.* 2004;95(4):334-41.
91. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-6.
92. Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 11):1743-53.
93. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):50-7.
94. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33-42.

95. Yurchenco PD, Smirnov S, Mathus T. Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins. *Methods Cell Biol.* 2002;69:111-44.
96. Ohori NP, Yousem SA, Griffin J, Stanis K, Stetler-Stevenson WG, Colby TV, et al. Comparison of extracellular matrix antigens in subtypes of bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol.* 1992;16(7):675-86.
97. Cox G, Steward WP, O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax.* 1999;54(2):169-79.
98. Liotta LA. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. *Am J Pathol.* 1984;117(3):339-48.
99. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.* 1983;49(6):636-49.
100. Watanabe N, Nakajima I, Abe S, Ogura S, Isobe H, Kawakami Y. Staining pattern of type IV collagen and prognosis in early stage adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol.* 1994;47(7):613-5.
101. Grigioni WF, Biagini G, Garbisa S, D'Errico A, Milani M, Mastroilli M, et al. Immunohistochemical study of basement membrane antigens in bronchioloalveolar carcinoma. *Am J Pathol.* 1987;128(2):217-24.
102. Fukushima M, Fukuda Y, Kawamoto M, Yamanaka N. Elastosis in lung carcinoma: Immunohistochemical, ultrastructural and clinical studies. *Pathol Int.* 2000;50(12):1004-13.

103. Eto T, Suzuki H, Honda A, Nagashima Y. The changes of the stromal elastotic framework in the growth of peripheral lung adenocarcinomas. *Cancer*. 1996;77(4):646-56.
104. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest*. 1983;48(6):656-77.
105. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J*. 2001;20(4):672-82.
106. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
107. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(5):C947-70.
108. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3(12 Pt 1):2485-92.
109. Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(2):94-5.
110. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(1):4-6.
111. Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol*. 1995;177(1):57-63.

112. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(12):881-6.
113. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
114. Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8761-6.
115. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9(6):677-84.
116. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 6ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 1985.
117. Terranova VP, Hujanen ES, Martin GR. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 1986;77(2):311-6.
118. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int.* 1997;47(7):461-9.
119. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):422-33.
120. Vracko R, Benditt EP. Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. *J Cell Biol.* 1972;55(2):406-19.

121. Kiyohara T, Kumakiri M, Kobayashi H, Ohkawara A, Lao LM. Atrophic dermatofibroma. Elastophagocytosis by the tumor cells. *J Cutan Pathol*. 2000;27(6):312-5.
122. Grosso LE. Synthesis of elastin by pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(1):5-9.
123. Remmele W, Dietz M, Schmidt F, Schicketanz KH. Relation of elastosis to biochemical and immunohistochemical steroid receptor findings, Ki-67 and epidermal growth factor receptor (EGFR) immunostaining in invasive ductal breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;422(4):319-26.
124. Feinmesser M, Schachter JM, Tobar A, Sulkes J, Gutman H, Kruk N, et al. Relationship of tumorigenic malignant melanomas to dermal elastin: an expression of tumor/stromal interaction that may be related to prognosis. *Am J Dermatopathol*. 2002;24(2):108-17.
125. Kuzuya M, Kanda S, Sasaki T, Tamaya-Mori N, Cheng XW, Itoh T, et al. Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*. 2003;108(11):1375-81.
126. Pai MR, Pai KN, Rao RV, Naik R, Shankarnarayana, Baliga P. Connective tissue stromal changes in tumours and tumour-like lesions of the breast. *Indian J Pathol Microbiol*. 1999;42(3):327-32.
127. Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, Verdetti J. Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2967-72.

128. Melis M, Baiocchini A, Soda G, Bosco D. Tenascin expression in elastotic cuffs of invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract*. 1997;193(7):479-84.
129. Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, et al. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):256-65.
130. Lohmann W, Schill WB, Bucher D, Peters T, Nilles M, Schulz A, et al. Elastosis and cancer. *Z Naturforsch [C]*. 1994;49(3-4):223-9.
131. Bunker ML, Raab SS, Landreneau RJ, Silverman JF. The diagnosis and significance of visceral pleural invasion in lung carcinoma. Histologic predictors and the role of elastic stains. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(6):777-83.
132. American Association of Neurological Surgeons. *Guidelines for the management of severe head injury*; 1995.
133. Epstein SK, Faling LJ, Daly BD, Celli BR. Predicting complications after pulmonary resection. Preoperative exercise testing vs a multifactorial cardiopulmonary risk index. *Chest*. 1993;104(3):694-700.
134. Goldman L, Caldera DL, Nussbaum SR, Southwick FS, Krogstad D, Murray B, et al. Multifactorial index of cardiac risk in noncardiac surgical procedures. *N Engl J Med*. 1977;297(16):845-50.
135. Melendez JA, Carlon VA. Cardiopulmonary risk index does not predict complications after thoracic surgery. *Chest*. 1998;114(1):69-75.

136. Epstein SK, Faling LJ, Daly BD, Celli BR. Inability to perform bicycle ergometry predicts increased morbidity and mortality after lung resection. *Chest*. 1995;107(2):311-6.
137. Wigren T, Oksanen H, Kellokumpu-Lehtinen P. A practical prognostic index for inoperable non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123(5):259-66.
138. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2002;23(1):65-81, viii.
139. Kirshbom PM, Harpole DH. Bronchial gland tumors. In: Pearson FG, Cooper JD, Deslauriers J, Ginsberg RJ, Hiebert CA, Patterson GA, et al. *Thoracic surgery*. Tradução de 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002. p. 763-71.
140. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. 1988;96(5):379-94.
141. Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: John Wiley & Sons; 1990.
142. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 2nd ed. Massachusetts: PWS Publishers; 1986.
143. Dawson B, Trapp R. *Basic and clinical biostatistics*. 2nd ed. Norwalk: Lange; 1994.
144. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. Amherst: John Wiley & Sow Inc; 1989.

145. Stewart J. *Cálculo*. 4ª ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning; 2002.
146. Naidich DP, Müller NL, Zerhouni EA, McGuinnes G, Webb WR, Glenn AK, et al. Mediastino / Câncer de pulmão. In: Naidich DP, Müller NL, Zerhouni EA, McGuinnes G, Webb WR, Glenn AK, et al. *Tomografia computadorizada e ressonância magnética do tórax*. Tradução de Mundim FD. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001. p. 37-154 e 329-364.
147. Francioni F, Rendina EA, Venuta F, Pescarmona E, De Giacomo T, Ricci C. Low grade neuroendocrine tumors of the lung (bronchial carcinoids)-25 years experience. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1990;4(9):472-6.
148. Schreurs AJ, Westermann CJ, van den Bosch JM, Vanderschueren RG, Brutel de la Riviere A, Knaepen PJ. A twenty-five-year follow-up of ninety-three resected typical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;104(5):1470-5.
149. Chughtai TS, Morin JE, Sheiner NM, Wilson JA, Mulder DS. Bronchial carcinoid--twenty years' experience defines a selective surgical approach. *Surgery*. 1997;122(4):801-8.
150. Johnson LA, Lavin P, Moertel CG, Weiland L, Dayal Y, Doos WG, et al. Carcinoids: the association of histologic growth pattern and survival. *Cancer*. 1983;51(5):882-9.
151. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Antibodies and Antigens. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular*

*Immunology*. Tradução de 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company;

1994. p. 33-64.

152. Godwin JD, 2nd. Carcinoid tumors. An analysis of 2,837 cases.

*Cancer*. 1975;36(2):560-9.

153. Godwin JD, 2nd, Brown CC. Comparative epidemiology of carcinoid and oat-cell tumors of the lung. *Cancer*. 1977;40(4):1671-3.

154. Wilson H, Storer EH, Star FJ. Carcinoid tumors. A study of seventy-eight cases. *Am J Surg*. 1963;105:35-9.

155. Teitelbaum SL. The carcinoid. A collective review. *Am J Surg*.

1972;123(5):564-72.

156. Okike N, Bernatz PE, Payne WS, Woolner LB, Leonard PF.

Bronchoplastic procedures in the treatment of carcinoid tumors of the tracheobronchial tree. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1978;76(3):281-91.

157. Davila DG, Dunn WF, Tazelaar HD, Pairolero PC. Bronchial carcinoid tumors. *Mayo Clin Proc*. 1993;68(8):795-803.

158. Mezzetti M, Raveglia F, Panigalli T, Giuliani L, Lo Giudice F, Meda S, et al. Assessment of outcomes in typical and atypical carcinoids according to latest WHO classification. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(6):1838-42.

159. Brandt B, 3rd, Heintz SE, Rose EF, Ehrenhaft JL. Bronchial carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg*. 1984;38(1):63-5.

160. Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol*.

2001;54(4):257-71.

161. Almeida Filho N, Rouquayrol MZ. Princípios de análise epidemiológica. In: *Introdução à epidemiologia moderna*. Tradução de. Salvador - Rio de Janeiro: Apce Abrasco; 1990. p. 115-30.
162. Ab' Saber AM, Massoni Neto LM, Bianchi CP, Ctenas BB, Parra ER, Eher EM, et al. Neuroendocrine and biologic features of primary tumors and tissue in pulmonary large cell carcinomas. *Ann Thorac Surg*. 2004;77(6):1883-90.
163. Pereira JCN, Silva AGP, Soares F, Ab'Saber AM, Schmidt A, Rodrigues OR, et al. Nuclear and environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. *Pathology*. 2004;200:459-67.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

## Quadro AP 1 – Classificação Histológica dos Tumores Pulmonares e Pleurais da Organização Mundial da Saúde de 1999

<p><b>1. Tumores Epiteliais:</b></p> <p><b>1.1. Benignos:</b></p> <p><b>1.1.1. Papilomas</b></p> <p>1.1.1.1. de células escamosas</p> <p>1.1.1.1.1. Exofítico</p> <p>1.1.1.1.1.1. Invertido</p> <p>1.1.1.2. Glandular</p> <p>1.1.1.3. Misto (de célula escamosa e glandular)</p> <p><b>1.1.2. Adenomas</b></p> <p>1.1.2.1. Alveolar</p> <p>1.1.2.2. Papilar</p> <p>1.1.2.3. do tipo células salivares</p> <p>1.1.2.3.1. de glândula mucosa</p> <p>1.1.2.3.2. Pleomórfico</p> <p>1.1.2.3.3. Outros</p> <p>1.1.2.4. Cistadenoma mucinoso</p> <p>1.1.2.5. Outros</p> <p><b>1.2. Lesões Pré-malignas:</b></p> <p>1.2.1. Displasia escamosa / carcinoma <i>in situ</i></p> <p>1.2.2. Hiperplasia adenomatosa atípica</p> <p>1.2.3. Hiperplasia de células neuroendócrinas pulmonares difusas idiopáticas</p> <p><b>1.3. Malignos:</b></p> <p><b>1.3.1. Carcinoma de células escamosas</b></p> <p>Variante:</p> <p>1.3.1.1. Papilar</p> <p>1.3.1.2. Células Claras</p> <p>1.3.1.3. Pequenas células</p> <p>1.3.1.4. Basalóide</p> <p><b>1.3.2. Carcinoma de pequenas células</b></p> <p>Variante:</p> <p>1.3.2.1. combinado com carcinoma de peq. células</p> <p><b>1.3.3. Adenocarcinoma</b></p> <p>1.3.3.1. Acinar</p> <p>1.3.3.2. Papilar</p> <p>1.3.3.3. Carcinoma bronquíolo-alveolar</p> <p>1.3.3.3.1. Não mucinoso</p> <p>1.3.3.3.2. Mucinoso</p> <p>1.3.3.3.3. Misto (mucinoso e não ou indeterminado)</p> <p>1.3.3.4. Sólido com formação mucinosa</p> <p>1.3.3.5. Misto</p> <p>1.3.3.6. Variantes</p> <p>1.3.3.6.1. Fetal bem-diferenciado</p> <p>1.3.3.6.2. Mucinoso (coloidal)</p> <p>1.3.3.6.3. Cistadenocarcinoma mucinoso</p> <p>1.3.3.6.4. em Anel de Sinete</p> <p>1.3.3.6.5. Células claras</p> <p><b>1.3.4. Carcinoma de grandes células</b></p> <p>Variante:</p> <p>1.3.4.1. Carcinoma neuroendócrino de grandes células</p> <p>1.3.4.1.1. Neuroendócrino de grandes cells combinados</p> <p>1.3.4.2. Basalóide</p> <p>1.3.4.3. tipo Linfoepitelioma</p> <p>1.3.4.4. Carcinoma de gds cells com fenótipo rabdoide</p> <p><b>1.3.5. Carcinoma adenoescamoso</b></p> <p><b>1.3.6. Carcinomas pleomórficos, sarcomatóides ou elementos sarcomatosos</b></p> <p>1.3.6.1. com células fusiformes e/ou gigantes</p> <p>1.3.6.1.1. Pleomórfico</p> <p>1.3.6.1.2. Carcinoma de células fusiformes</p> <p>1.3.6.1.3. Carcinoma de células gigantes</p> <p>1.3.6.2. Carcinosarcomas</p> <p>1.3.6.3. Blastoma</p> <p>1.3.6.4. Outros</p>	<p><b>1.3.7. Tumores Carcinóides</b></p> <p>1.3.7.1. Carcinóide Típico</p> <p>1.3.7.2. Carcinóide Atípico</p> <p><b>1.3.8. Carcinomas tipo células tipo salivares</b></p> <p>1.3.8.1. Mucoepitelióide</p> <p>1.3.8.2. Adenóide cístico</p> <p>1.3.8.3. Outros</p> <p><b>1.3.9. Carcinomas não classificados</b></p> <p><b>2. Tumores de Partes Moles:</b></p> <p>2.1. Tumor fibroso localizado</p> <p>2.2. Hemangioendolinfoma epitelióide</p> <p>2.3. Blastoma pleuropulmonar</p> <p>2.4. Condroma</p> <p>2.5. Pseudotumor fibroso calcificante da pleura</p> <p>2.6. Tumor miofibroblástico peribronquial congênito</p> <p>2.7. Linfangiomatose pulmonar difusa</p> <p>2.8. Tumor desmoplásico de células pequenas</p> <p>2.9. Outros</p> <p><b>3. Tumores Mesoteliais:</b></p> <p><b>3.1. Benignos:</b></p> <p>3.1.1. Tumor adenomatóide</p> <p><b>3.2. Malignos (Mesoteliomas):</b></p> <p>3.2.1. Epitelióide</p> <p>3.2.2. Sarcomatóide</p> <p>3.2.2.1. Mesotelioma desmoplásico</p> <p>3.2.3. Bifásico</p> <p>3.2.4. Outros</p> <p><b>4. Miscelânea:</b></p> <p>4.1. Hamartoma</p> <p>4.2. Hemangioma esclerosante</p> <p>4.3. de células claras</p> <p>4.4. Neoplasmas de células germinativas</p> <p>4.4.1. Teratoma maturo ou imaturo</p> <p>4.4.2. Tumor maligno de células germinativas</p> <p>4.5. Timoma</p> <p>4.6. Melanoma</p> <p>4.7. Outros</p> <p><b>5. Doenças Linfoproliferativas:</b></p> <p>4.1. Pneumonia linfóide intersticial</p> <p>4.2. Hiperplasia nodular linfóide</p> <p>4.3. Linfoma MALT</p> <p>4.4. Granulomatose linfomatóide</p> <p><b>6. Tumores Secundários</b></p> <p><b>7. Tumores Sem Classificação</b></p> <p><b>8. Lesões Pseudo-Neoplásicas:</b></p> <p>8.1. Tumorlet</p> <p>8.2. Nódulos meningoepitelióides múltiplos</p> <p>8.3. Histiocitose de células de Langerhans</p> <p>8.4. Pseudotumor inflamatório</p> <p>8.5. Pneumonia organizada</p> <p>8.6. Tumor amilóide</p> <p>8.7. Granuloma hialinizado</p> <p>8.8. Linfangioleiomatose</p> <p>8.9. Hiperplasia pneumocítica micronodular multifocal</p> <p>8.10. Endometriose</p> <p>8.11. Polipose bronquial inflamatória</p> <p>8.12. Outros</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

FONTE: WHO/IASLC classification of lung and pleural tumours, 1999.

**APÊNDICE B**

**Aprovação do Protocolo de Pesquisa 315/03 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) de 14 de maio de 2003.**

APÊNDICE C

**Tabela AP 1 – Análise do tempo de sobrevivência global  
(Kaplan-Meier)**

Tempo (meses)	Situação	Sobrevivência Acumulada	Erro Padrão	Eventos Acumulados	Número de Remanescentes
0	3			0	54
3	2	0,9815	0,0183	1	53
12	2	0,9630	0,0257	2	52
18	3			2	51
60	1			3	50
60	1			4	49
60	1			5	48
60	1			6	47
60	1			7	46
60	1			8	45
60	1			9	44
60	1			10	43
60	1			11	42
60	1			12	41
60	1			13	40
60	1			14	39
60	1			15	38
60	1			16	37
60	1			17	36
60	1			18	35
60	1			19	34
60	1			20	33
60	1			21	32
60	1			22	31
60	1			23	30
60	1			24	29
60	1			25	28
60	1			26	27
60	1			27	26
60	1			28	25
60	1			29	24
60	1			30	23
60	1			31	22
60	1			32	21
60	1			33	20
60	1			34	19
60	1			35	18
60	1			36	17
60	1			37	16
60	1			38	15
60	1			39	14
60	1			40	13
60	1			41	12
60	3			42	11
60	1			43	10
60	1			44	9
60	1			45	8
60	1			46	7
60	1			47	6
60	1			48	5
60	1			49	4
60	1			50	3
60	1			51	2
60	1			52	1
60	1	0,0000	0,0000	53	0

LEGENDA: Situação: 1 = vivo; 2 = óbito relacionado; 3 = óbito não correlacionado.

APÊNDICE D

Tabela AP 2 – Análise do tempo de sobrevivência livre de doença (Kaplan-Meier)

Tempo (meses)	Situação	Sobrevivência Acumulada	Erro Padrão	Eventos Acumulados	Número de Remanescentes
0	3			0	54
3	2	0,9815	0,0183	1	53
6	2	0,9630	0,0257	2	52
12	2	0,9444	0,0312	3	51
18	2	0,9259	0,0356	4	50
60	1			5	49
60	1			6	48
60	1			7	47
60	1			8	46
60	1			9	45
60	1			10	44
60	1			11	43
60	1			12	42
60	1			13	41
60	1			14	40
60	1			15	39
60	1			16	38
60	1			17	37
60	1			18	36
60	1			19	35
60	1			20	34
60	1			21	33
60	1			22	32
60	1			23	31
60	1			24	30
60	1			25	29
60	1			26	28
60	1			27	27
60	1			28	26
60	1			29	25
60	1			30	24
60	1			31	23
60	1			32	22
60	1			33	21
60	1			34	20
60	1			35	19
60	1			36	18
60	1			37	17
60	1			38	16
60	1			39	15
60	1			40	14
60	1			41	13
60	1			42	12
60	3			43	11
60	1			44	10
60	1			45	9
60	1			46	8
60	1			47	7
60	1			48	6
60	1			49	5
60	1			50	4
60	1			51	3
60	1			52	2
60	1			53	1
60	1	0,0000	0,0000	54	0

LEGENDA: Situação: 1 = vivo sem doença; 2 = metástase; 3 = censurado.

## APÊNDICE E

Pereira JCN, Silva AGP, Soares F, Ab'Saber AM, Schmidt A, Rodrigues OR, Garippo A, Capelozzi M, Campos JRM, Takagaki T, Jatene FBJ, Capelozzi VL. Nuclear and environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. *Pathol Res Pract.* 2004; 200:459-67.