

FERNANDO MOURA SILVA

**Expressão de receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2)
e a sua relação com metástase linfática e variáveis
clínicas pré-operatórias em tumores carcinóides
broncopulmonares típicos**

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

São Paulo

2008

FERNANDO MOURA SILVA

**Expressão de receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2)
e sua relação com metástases linfática e variáveis clínicas pré-
operatórias em tumores carcinóides broncopulmonares típicos**

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

Área de Concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Dr. José Ribas Milanez de Campos

SÃO PAULO

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Fernando Moura

Expressão de receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2) e sua relação com metástase linfática e variáveis clínicas pré-operatórias em tumores carcinóides broncopulmonares típicos / Fernando Moura Silva. -- São Paulo, 2008.

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.

Descritores: 1.Tumor carcinóide/classificação 2.Receptores de somatostatina/classificação 3.Tumores neuroendócrinos/classificação 4.Neoplasias brônquicas/classificação 5.Octreotida/uso diagnóstico 6.Octreotida/uso terapêutico

USP/FM/SBD-256/08

"Nossa maior fraqueza é a desistência. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas uma vez mais."

Thomas A. Edison

Dedico este trabalho aos meus
pais Maria Regina e Edson Luiz,
meus exemplos de vida e
conduta.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato a todos os pacientes que privilegiaram esse grupo de pesquisa com sua confiança, partilhando conosco as inevitáveis perdas e diminuições da vida e que, com seu desprendimento, transformaram sua luta em perspectiva de auxílio aos pacientes que virão.

Sinto-me privilegiado de ter como professor e amigo o Prof. Dr. João Carlos das Neves Pereira, cujo conhecimento, interesse apaixonado e exemplo incentivaram-me no aprimoramento profissional e acadêmico. Por sua franqueza, sua crítica lógica e suave, seu brilhantismo e incansável orientação, devo-lhe mais do que é possível expressar em palavras.

O Prof. Dr. José Ribas Milanez de Campos, orientou esta tese com precisão, paciência e gentileza. Agradeço-o por me encorajar, celebrar meu avanço e pelo auxílio na obtenção dos recursos que financiaram este estudo.

Ofereço minha gratidão a Prof^a Dra Vera Luiza Capellozzi, minha co-orientadora, que me acolheu generosamente em seu laboratório e auxiliou-me com grande inteligência e dedicação. Certamente ensinou-me e inspirou-me muito mais do que possa parecer.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pego Fernandes, cujo aconselhamento foi decisivo na obtenção das verbas de apoio que viabilizaram este estudo. Suas observações perspicazes foram essenciais para a conclusão da tese.

O Dr. Alexandre Muxfeldt Ab'Saber contribuiu com sugestões e disposição excepcionais. Sua prestimosidade e sabedoria me deu confiança em todos os aspectos.

O Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira foi crucial na condução da análise estatística e epidemiológica do estudo e imprimiu ânimo à sua conclusão.

Sou grato ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas que sempre respondeu às minhas perguntas com sabedoria, consideração e disposição.

Guardarei no coração a lembrança da enorme dedicação das amigas Esmeralda Miristene Eher e Sandra de Moraes Fernezlian.

Outras para com quem tenho dívida pelo apoio, estímulo, amizade e auxílio são Eva Malheiros de Oliveira, Juliana Lattari Sobrinho e Neusa Rodrigues Dini.

Dra Rosângela Monteiro foi encorajadora e terna durante toda a execução do projeto.

Agradeço a Dra Elaine Stabenow por ser tão sensata, generosa e dedicada também à minha causa.

Sou profundamente grato a amiga Valquíria Ritter que sempre esteve ao meu lado, oferecendo-me amizade e suporte irrestritos.

Por fim, agradeço aos meus pais e ao meu irmão Rodrigo que ao longo de minha vida sempre me apoiaram incondicionalmente. São minha base de apoio e Amor.

Normatização adotada

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. O espectro das proliferações de células neuroendócrinas no tecido broncopulmonar.....	3
1.2. Histórico	6
1.3. Classificações da Organização Mundial de Saúde (OMS).....	7
1.4. Epidemiologia e etiologia	8
1.5. Características clínicas	9
1.6. Tratamento dos tumores carcinóides broncopulmonares	10
1.6.1. Tratamento cirúrgico.....	10
1.6.2. Quimioterapia	13
1.6.3. Radioterapia	15
1.7. Somatostatina	15
1.8. Receptores de somatostatina e análogos da somatostatina.....	16
1.9. Fisiologia dos receptores de somatostatina	18
1.10. Expressão de SSTR em neoplasias.....	21
1.11. Análogos sintéticos da somatostatina	22
1.12. Análogos sintéticos da somatostatina e radionuclídeos	22
1.12.1. Radionuclídeos.....	22
1.12.2. Diagnóstico e estadiamento	23
Octreoscan®	23
1.12.3. Tratamento com radionuclídeos – terapia alvo.....	25
2. OBJETIVOS DO ESTUDO	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	31
3.1. Casuística	31
3.2. Confirmação do diagnóstico histológico	33
3.3. Técnica imunohistoquímica empregada na detecção dos antígenos.....	36
3.4. Quantificação da marcação encontrada	38
3.4.1. Determinação dos índices imunohistoquímicos (Ie)	38
3.5. Organização dos dados	41
3.6. Método para análise estatística.....	41
3.6.1. Predição de risco individual	43

4. RESULTADOS	46
4.1. Estatística descritiva	46
4.2. Comparações entre as frequências e entre as médias das características clínicas pré-operatórias.....	50
4.2.1. Comparação das médias de idade (com o intervalo de confiança do erro da média em 95%) segundo o gênero	50
4.2.2. Comparação das médias de idade segundo a ocorrência de metástase linfática	51
4.2.3. Comparação da ocorrência de metástase linfática segundo o gênero.....	51
4.2.4. Comparação da ocorrência de metástase linfática segundo a presença ou ausência de sintomas	51
4.2.5. Comparação da frequência de metástase linfática segundo a presença ou não de emagrecimento	51
4.2.6. Comparação da frequência de metástase linfática segundo a posição central ou periférica do tumor	52
4.2.7. Comparação das médias de idade segundo a posição central ou periférica do tumor.....	52
4.2.8. Comparação da frequência de metástase hematogênica segundo a ocorrência de emagrecimento	52
4.3. Comparação de medianas	53
4.3.1. Comparação de medianas entre os grupos com e sem metástase linfática	53
4.3.2. Comparação de medianas entre os grupos com e sem metástase hematogênica.....	53
4.4. Padrões de expressão imunohistoquímico e do índice de imunoeexpressão do SSTR-2.....	54
4.4.1. Distribuição dos tumores segundo a imunoeexpressão de SSTR-2.....	54
4.4.2. Distribuição das variáveis categóricas para a quantificação das Porcentagens (P%) de área tingidas com o marcador de SSTR-2 na amostra das lâminas dos pacientes e distribuição da quantificação da Intensidade (I) de imunomarcacão com SSTR-2 na amostra das lâminas dos pacientes	57
4.4.3. Distribuição dos valores do Índice de Imunoeexpressão (Ie)	58
4.4.4. Comparação da frequência de metástase linfática segundo a presença de receptores SSTR2.....	58
4.4.5. Média do índice de expressão do SSTR-2	58
4.5. Resultados da análise multivariada.....	59
4.5.1. Predição de metástase linfática.....	59
4.5.1.1. SSRT-2 como variável binária: presença ou ausência	59
4.5.1.2. SSRT-2 como variável categórica	65

5. DISCUSSÃO	68
5.1. Limitações do método	68
5.2. Discussão acerca do espectro das proliferações neuroendócrinas broncopulmonares	72
5.3. Discussão dos resultados	75
5.3.1. Discussão da estatística descritiva	75
5.3.2. Expressão dos receptores de somatostatina (SSTR-2)....	79
5.4. Importância clínica e aplicabilidade da expressão dos receptores de somatostatina tipo 2 em tumores carcinóides broncopulmonares típicos	80
5.4.1. Uso em diagnóstico e em estadiamento.....	80
5.4.2. Estadiamento intra-operatório	83
5.4.3. Tratamento com terapia alvo.....	83
6. CONCLUSÕES	86
7. ANEXOS	
Anexo A.....	88
Anexo B.....	94
8. REFERÊNCIAS	97

Apêndices

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5'Nase	5'-nucleotidase
5-HIAA	Ácido 5 Hidroxindoleacético
5-HT	Glucanona e Serotonina
ACTH	Hormônio Adreno Córtico-Trófico
AgNOR	Regiões organizadoras de nucleolus
Akt	Quinase PI-3 dependente da serina-treonina quinase
AMP	Adenosina monofosfato
Ang-1	Angiopoeína 1
AZD2171	Droga em estudo clínico
Bak	Proteína Bak
Bax	Proteína Bax
Bcl-2	Antígeno marcador de células de linfoma B
BSA	Soro Albumina Bovina
CA	Carcinóide Atípico
Ca ⁺²	Cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD 14	Catepsina D-14

CD 34	Catepsina D-34
CD 44	Catepsina D-44
CGA	Campos de Grande Aumento
C-pro	Porção terminal C
CSF-1R	Receptor do fator de estimulação de colônias Tipo 1
CT	Carcinóide Típico
DAB	3-3'-diaminobenzamida
DAPase	Dipeptidil-aminopeptidase IV
DESC	Desconhecido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
Dr.	Doutor
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
Ed.	Edição
Et al.	E colaboradores
FA	Fosfatase alcalina
FGF-2	Fator de crescimento 2
FLT-3	Tirosina quinase-3
G1	Fase um do ciclo celular

GH	Hormônio do crescimento
GH-RH	Hormônio Liberador de Hormônio de Crescimento
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
IHQ	Imunohistoquímica
IML	Instituto Médico Legal
INCOR	Instituto do coração
IPI	Índice imuno-histoquímico
Ki-67	Proteína nuclear Ki-67
KIT	Receptor do fator de células-tronco
LSAB	“Labeled Streptavidin-Avidin-Biotin”
LYVE-1	Receptor endotelial de vaso linfático (<i>“Lymphatic vessel endothelial receptor -1”</i>)
M	Metástase hematogênica
MAPK	Proteína quinase MAP
N	Linfonodos regionais
n	Frequência
NM	Linfonodos regionais e metástase hematogênica
NORs	Regiões organizadoras de nucléolo
N-pro	Porção terminal N

OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Probabilidade de erro alfa
p.	Página
p53	Proteína nuclear p53
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR α	Receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas α
PDGFR β	Receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas β
Pi	Somatória dos pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico
PKC	Via dependente de p42/p44
Prof.	Professor
Prox-1	<i>“Prospero-related homeobox gene-1”</i>
PTK 787/ZK 222584	Droga em estudo clínico
P _{tumor}	Somatória do total de pontos que incidem sobre células tumorais
Raf	Proteína Raf
Ras	Oncogene
RET	Receptor do fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial
RNA	Ácido ribonucleico

RNA _m	RNA mensageiro
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SPSS	“Statistical Package for Social Science”
SST	Somatostatina
SSTR-2	SSTR-2
SVO	Serviço de verificação de óbito
T	Tamanho do tumor primário
Tie-2	Receptor de tirosina quinase
TKRs	Tirosina-quinases ligadas ao recepto
TNM	Sistema internacional de classificação de tumores malignos
TSH	Hormônio tireo estimulante
UICC	“Union Internationale Contre le Cancer”
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (“ <i>vascular endothelial growth factor</i> ”)
VEGFR	Receptor de crescimento endotelial vascular (“ <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> ”).
VHD	Domínio homólogo
VIP	Peptídeo Vasoativo intestinal
WHO	World Health Organization
$\alpha\beta 1$	Proteína da superfície da membrana celular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo geral de receptor de SST acoplado a Proteína G. Receptores de SST pertencem à superfamília de receptores com sete domínios transmembrana. As letras do alfabeto Grego denotam as subunidades da proteína G	17
Figura 2 - Ação anti-proliferativa da SST	19
Figura 3 - Fotomicrografia de carcinóide bronco-pulmonar típico em coloração por Hematoxilina-eosina (400x) caso 26	34
Figura 4 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para SSTR-2 em aumento de 400x. Nota-se coloração nos citoplasmas das células neoplásicas (caso nº 58).....	39
Figura 5 - Gráfico da distribuição dos pacientes de acordo com o gênero..	47
Figura 6 - Gráfico da distribuição dos pacientes de acordo com a localização do tumor	49
Figura 7 - Gráfico da comparação entre as médias de idade segundo o gênero	50
Figura 8 - Gráfico da porcentagem de casos com presença ou ausência do SSTR-2	54
Figura 9 - Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcaçãode SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 15: Índice de imunoexpressão = 0)	55
Figura 10 - Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcaçãode SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 26: Índice de imunoexpressão = 3)	55
Figura 11 - Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcaçãode SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 19: Índice de imunoexpressão = 6)	56
Figura 12 - Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcaçãode SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 56: Índice de imunoexpressão = 9)	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Afinidade da Somatostatina e de seus análogos sintéticos aos subtipos de receptores. Valores nanomolares para ocupar 50% dos receptores. IC 50 (nM)	18
Tabela 2 - Resumo das características dos subtipos de SSTR humanos .	20
Tabela 3 - Expressão de receptores de somatostatina em tumores	21
Tabela 4 - Características dos principais radionuclídeos aplicados em carcinóides típicos e atípicos	23
Tabela 5 - Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos	35
Tabela 6 - Distribuição das variáveis categóricas da quantificação de porcentagens e intensidade de SSTR-2	57
Tabela 7 - A distribuição dos valores do le	58
Tabela 8 - Variáveis independentes não incluídas na Equação ("step" 0) ..	60
Tabela 9 - Variáveis independentes incluídas no modelo ("step" 0).....	61
Tabela 10 - Classificação de concordância entre observado e predito segundo a equação nula ("Step"0).....	62
Tabela 11 - Classificação de concordância entre observado e predito segundo a primeira e a segunda equações propostas que contêm variáveis independentes preditivas de metástase linfática.....	63
Tabela 12 - Razão de chances da ocorrência de metástase linfática (Exp(B)) referente às variáveis independentes preditivas do fenômeno em duas equações logísticas propostas: com uma ("step" 1) e com duas variáveis ("step" 2).....	64

Silva FM. *Expressão de receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2) e a sua relação com metástase linfática e variáveis clínicas pré-operatórias em tumores carcinóides broncopulmonares típicos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 112 p.

Os tumores carcinóides broncopulmonares típicos (CT) são proliferações de células neuroendócrinas. Foram consideradas como adenomas e acreditava-se que não tinham potencial para disseminação hematogênica e linfática. Porém, a ocorrência de metástase linfática e hematogênica acontece em um quinto dos indivíduos acometidos por essa patologia. A variação no comportamento clínico dos carcinóides broncopulmonares torna imperativa a realização de pesquisas que visem à melhor compreensão dessa doença. É fundamental determinar a agressividade e o risco individual da ocorrência de metástase linfática e hematogênica para que se possa oferecer um tratamento individualizado para cada binômio doente-doença. A classificação atual divide os tumores carcinóides, conforme o grau histológico de malignidade em típico e atípico, agrupando as neoplasias de acordo com o índice mitótico, relação volumétrica núcleo/citoplasma, presença ou ausência de necrose, pleomorfismo nuclear e invasão vascular. Receptores celulares na superfície externa da membrana plasmática podem ser ubiquamente expressos em diversos tipos celulares ou específicos para determinada população celular. Os receptores de somatostatina são específicos de células neuroendócrinas e também são expressos nas neoplasias desta natureza. Existem 5 tipos de receptores de somatostatina (SSTR). A interação da somatostatina (SST) com seu receptor específico provoca as inibições do ciclo celular e da angiogênese, bem como estimula a apoptose. A meia-vida plasmática da SST é breve. Análogos com menor metabolização eram necessários. Foram desenvolvidos os análogos como octreotide e lanreotide. Estes análogos foram acoplados à radionuclídeos, possibilitando aplicação em diagnóstico, estadiamento e tratamento dos tumores neuroendócrinos. O SSTR do tipo 2 possui maior afinidade pela somatostatina.

A expressão imunohistoquímica de SSTR-2 em carcinóide típicos ofereceria métodos adicionais de diagnóstico e tratamento para esta doença. Com o objetivo de demonstrar a expressão de SSTR-2 em carcinóides broncopulmonares típicos, bem como verificar se existia relação entre a expressão e ocorrência de metástase linfática 62 pacientes tiveram suas amostras de tumor submetidas ao método imunohistoquímico. Verificou-se, ademais, se a expressão de SSTR-2 e o índice de expressão imunohistoquímica eram variáveis independentes preditivas do risco de metástase linfática.

A relação entre expressão de SSTR-2 e variáveis clínicas pré-operatórias também foi analisada. 36 pacientes tinham tumores que expressavam SSTR-2 (58,1%), enquanto 26 doentes tinham tumores que não expressavam SSTR-2 (41,9%). Não existiu diferença estatística significativa entre a expressão de SSTR-2 e a ocorrência de metástase linfática (teste exato de Fisher, $p=0,529$). Também não existiram diferenças estatísticas significantes nas análises multivariadas que testaram se tanto o SSTR-2

quanto o índice de imunohistoquímica eram variáveis independentes preditivas do risco de metástase linfática. Neste estudo, os CT expressaram SSTR-2. Além disso, não existiu relação entre a ocorrência de metástase linfática e a expressão de SSTR-2. Por fim, o SSTR-2 e o índice imunohistoquímico não foram variáveis independentes do risco de metástase linfática.

Descritores: 1.Tumor carcinóide/classificação 2.Receptores de somatostatina/classificação 3.Tumores neuroendócrinos/classificação 4.Neoplasias brônquicas/classificação 5.Octreotida/uso diagnóstico 6.Octreotida/uso terapêutico

Silva FM. *Expression of somatostatin receptor type 2 (SSTR-2) and its relation with lymphatic metastasis and preoperative clinical features in typical bronchopulmonary carcinoid tumors* [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2008.

Typical pulmonary carcinoids are neuroendocrine cells proliferations and they were former considered lung adenomas with no hematogenic or lymphatic metastatic potential. However, it is known that up to 20% of patients develop metastatic disease. It is mandatory that new studies be developed due to the variation in clinical presentation of these patients. It is also required that the individual risk of lymphatic and hematogenic metastasis be determined in order to individualize the patient's treatment. Pulmonary carcinoids are classified according to hystologic grade. The current classification includes hystologic grade, presence or absence of necrosis, nuclear pleomorphism, and vascular invasion. Somatostatin receptors (SSTR) are neuroendocrine cell specific receptors and can be detected in neuroendocrine tumors as well. There are 5 SSTR's subtypes. Somatostatin is a peptide that inhibits the cell cycle and angiogenesis as well as increases the apoptosis by binding to SSTR. The use of long-acting form of octreotide (a SST analogue) has been associated with treatment (radiolabeled somatostatin analogs) and diagnosis (OctreoScan®). Encouraging results have been obtained with the use of radiolabeled somatostatin analogs yttrium-90 and Lu-177 to treat patients with neuroendocrine tumors. This study was designed to evaluate if typical bronchopulmonary carcinoid expressed Somatostatin receptor type 2 using the the immunohistochemical technique to identify Somatostatin receptor type 2. This study verified if there was relation between Somatostatin receptor type 2 expression and lymphatic metastasis. Futhermore, we verified if Somatostatin receptor type 2 and imunnohistochemistry score would be independent predictive markers to lymphatic metastasis. 62 patients were evaluated. 36 (58,1%) patients expressed Somatostatin receptor type 2 in their tumor samples whereas 26 (41,9%) patients did not express Somatostatin receptor type 2. This study did not verify significant statistical difference between SSTR-2 expression and lymphatic metastasis. Somatostatin receptor type 2 and imunnohistochemistry score were not independent predictive markers to lymphatic metastasis. There were no significant statistical differences on multivariate analyses. In conclusion this study verified that there was Somatostatin receptor type 2 expression on tumor samples studied but there was no relation between Somatostatin receptor type 2 and lymphatic metastasis. Futhermore, Somatostatin receptor type 2 and its imunnohistochemistry score were not independent predictive markers to lymphatic metastasis.

Key words: 1.Carcinoid tumors/classification 2.Neuroendocrine tumors/classification 3.Neuroendocrine carcinoma/classification 4.Bronchial neoplasms/classification 5.Somatostatin receptors/classification

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os receptores celulares na superfície externa da membrana citoplasmática podem ser ubiquamente expressos em diversos tipos celulares ou específicos para determinada população celular¹.

Os receptores de somatostatina são específicos de células neuroendócrinas e estão também expressos nas neoplasias dessa natureza².

Devido a sua especificidade, podem ser utilizados na detecção de células neuroendócrinas malignas. Um exemplo prático de sua utilização é o uso do OctreoScan® para diagnóstico e estadiamento³.

Quanto à aplicação terapêutica pode-se citar a terapia alvo com radiofármacos ou nanopartículas⁴.

Os tumores carcinóides são proliferações celulares neuroendócrinas que podem expressar os receptores de somatostatina e são derivadas das células do epitélio ventilatório denominadas células de Kulchitsky⁵⁻⁷ perfazendo de 0.5 a 5% das neoplasias primárias de pulmão^{8,9}.

De acordo com o grau histológico de malignidade são classificados em carcinóides típicos (CT) ou atípicos^{10,11}.

Os primeiros são considerados neoplasias de baixo grau de malignidade e acreditava-se, até pouco tempo atrás, sem potencial para o desenvolvimento de metástase por via hematogênica ou linfática.

Atualmente, contudo, observa-se com frequência o relato de ocorrências de metástases em indivíduos acometidos por esta doença¹²⁻¹⁴.

Alguns estudos reportam ocorrência de metástase linfática variando entre 10 e 20 %¹⁵⁻¹⁷ enquanto uma extensa série holandesa relata detecção de metástase hematogênica em até 2% dos casos de carcinóides broncopulmonares típicos, demonstrando, na verdade, que esta doença indolente pode se tornar agressiva em um subgrupo de pacientes¹⁸.

Neste contexto, torna-se mandatório aprofundar o estudo desta entidade nosológica, que talvez compreenda não apenas uma entidade, mas uma verdadeira gama de proliferações, desde hiperplasias até neoplasias invasivas e metastáticas. É imperativo compreender que mecanismos capacitam estas células a disseminar para linfonodos e para outros órgãos.

A compreensão destes fenômenos poderia auxiliar o desenvolvimento de modelos matemáticos para a predição do risco individual destes eventos, bem como disponibilizar ou justificar a indicação de métodos diagnósticos mais sensíveis, a fim de aprimorar o estadiamento pré-operatório.

1.1 O ESPECTRO DAS PROLIFERAÇÕES DE CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS NO TECIDO BRONCOPULMONAR

As células neuroendócrinas estão distribuídas ao longo de todo epitélio broncopulmonar ora em grupos – denominados corpos de Kulchitsky – ora de maneira isolada^{13,14,19}.

A despeito de sua pequena densidade são ubiquamente localizadas em quaisquer segmentos das vias aéreas, porém localizam-se preferencialmente nos brônquios lobares e principais, e raramente na carina ou nas regiões parenquimatosas periféricas^{20,21}.

Possuem função de quimiorreceptores e são sensíveis a alterações das pressões parciais de gases, tanto alveolares quanto sangüíneas²².

Apesar de não serem conhecidos todos os fatores que induzem a sua proliferação, sabe-se que ocorre hiperplasia em resposta às baixas concentrações de oxigênio ou às altas de gás carbônico²³⁻²⁵.

Além disso, estas células tornam-se mais numerosas em associação com doenças pulmonares crônicas. Nota-se ocorrência de hiperplasia de células neuroendócrinas em tecidos adjacentes a processos neoplásicos, infecciosos ou em tecidos envolvidos com resposta inflamatória²⁶⁻²⁸.

Os patologistas classificam estes amontoados de células de Kulchitsky como “Tumorlets”, baseados apenas na coloração tradicional pela hematoxilina e eosina. Estes, por definição, devem ter o maior diâmetro inferior a 5mm. Do contrário, em situações em que existem aglomerados celulares maiores que 5 mm, são classificados como tumores carcinóides típicos²⁹. Ao contrário da expectativa, observou-se, no ambulatório especializado no seguimento de pacientes operados de tumores carcinóides broncopulmonares, um caso de uma mulher na quinta década de vida que apresentou macrometástase linfática em mediastino, secundária a uma lesão classificada inicialmente como Tumorlets³⁰.

Todos os tumores classificados como carcinóides típicos são considerados verdadeiras neoplasias, mesmo que em alguns casos não se observem quaisquer características indicativas de malignidade. Os critérios que os definem como típicos são: menos do que duas figuras de mitose a cada 10 campos microscópicos com aumento de 400x (10 campos de grande aumento – CGA) e ausência de áreas de necrose^{11,12,14,31}.

Os tumores carcinóides atípicos, por sua vez, são mais facilmente aceitos como sendo carcinomas^{10,32,33}, 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) e clinicamente evoluem de forma mais agressiva^{11,14,31}.

O espectro das proliferações celulares neuroendócrinas também compreende as proliferações com alto grau de malignidade, como por exemplo, os carcinomas de grandes e de pequenas células^{34,35}.

Não existem evidências de que as hiperplasias sejam proliferações pré-malignas ou de que exista progressão maligna de um grupo para outro mais agressivo. No entanto, existem evidências epidemiológicas de que cada grupo deste espectro de proliferações ocorreria de maneira independente²⁵, ressalva feita à polêmica existente na diferenciação entre hiperplasia de células de Kulchitsky e o tumor carcinóide típico³⁶.

Tentativas para definir e qualificar o potencial maligno de cada uma das proliferações celulares por meio de estudos de material genético^{21,37,38}, de macromoléculas celulares⁷ ou da matriz extracelular têm sido realizadas^{30,39}.

Talvez mais importante que propor nomenclaturas seja aprimorar o estadiamento, prever o risco individual da ocorrência de fenômenos mórbidos como invasão tecidual e metástases (evidentes mesmo em tumores carcinóides broncopulmonares típicos) e possibilitar tratamento com terapias alvo para alguns doentes.

1.2 HISTÓRICO

A primeira descrição clínica do que provavelmente teria sido um tumor carcinóide brônquico foi reportada em 1831 por Laënnec⁴⁰. Em sua descrição de como usufruir de seu estetoscópio recém desenvolvido, o autor descreveu detalhadamente a ausculta de um pulmão atelectasiado por uma lesão endoluminal de crescimento lento, que desencadeava pneumonias de repetição e tosse com hemoptise, em uma mulher jovem não tabagista.

Os primeiros relatos de caso de tumor carcinóide com comprovação histológica foram de Lubarsch⁴¹ em 1888. O autor descreveu dois casos de pacientes com múltiplos tumores em íleo distal, descobertos à necropsia.

No entanto, o termo carcinóide foi sugerido e empregado somente em 1907 por Oberndorfer⁴² para a descrição de lesões tumorais que se assemelhavam morfológicamente a carcinomas, mas apresentavam comportamento clínico mais indolente, e que ocorriam nos segmentos bronco-pulmonares ou no trato gastrointestinal.

Em todas essas descrições predominava o conceito de que os tumores carcinóides eram tumores benignos, portanto incapazes para promover invasão e metástase. Ao longo de grande parte do século XX este conceito perdurou, apesar da crescente descrição de invasão e metástase associadas aos relatos desta doença¹⁰. Somente na década de 80 do século passado tal conceito fora abandonado.

1.3 CLASSIFICAÇÕES DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS)

Na classificação anterior a 1981 proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores carcinóides brônquicos eram considerados adenomas, por acreditar-se que representavam neoplasias de malignidade intermediária entre os hamartomas e os carcinomas primários de pulmão. Entretanto, os relatos de comportamento metastático linfático e extratorácico exigiram reconsideração deste conceito^{31,43}.

Em 1982, a OMS⁴⁴ classificaria os tumores neuroendócrinos pulmonares como neoplasias malignas, dividindo-os em dois grandes grupos: o primeiro incluiria os tumores carcinóides (típicos e atípicos) e o segundo os carcinomas pulmonares de grandes e o de pequenas células. Esta postura foi mantida pela revisão de 2004 (Apêndice A – Quadro 1). As características histológicas que definem o diagnóstico de tumor carcinóide típico (CT) ou atípico (CA) ou carcinoma de pequenas células são^{31,45}:

- relação volumétrica núcleo/citoplasma

- número de mitoses em 10 campos de maior aumento
- necrose
- pleomorfismo
- invasão vascular

1.4 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos têm demonstrado progressivo aumento no diagnóstico desta doença em diversos sítios^{46,47}. Um estudo sueco, conduzido por Berge, reporta incidência de 8.4 casos para cada 100.000 pessoas na Escandinávia, numa população seguida por mais de uma década⁴⁷.

A incidência de carcinóides broncopulmonares aumentou nos EUA, de acordo com análise de 5468 casos identificados pelo programa SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) do Instituto Nacional do Câncer dos EUA entre 1973 e 1991⁴⁸. A maior incidência pode ser decorrente da maior acurácia no diagnóstico ou da real elevação do número de indivíduos acometidos pela doença.

Conforme mencionado, os tumores carcinóides broncopulmonares compreendem de 0.5 a 5% das neoplasias primárias de pulmão^{8,9} e incidência anual de 2 casos por milhão de habitantes em uma determinada população⁴⁹. Algumas séries reportam incidência discretamente elevada em

mulheres (variando de 1,6 a 2 mulheres para cada homem)^{30,49}, enquanto outras relatam incidência similar entre os gêneros⁵⁰⁻⁵³.

Em um estudo de indivíduos com carcinóides típicos a ocorrência de metástase em linfonodos em cadeia N1, N2 e N3 foi de 10%, 3% e ausência de acometimento respectivamente⁴⁹.

Em outro, realizado por Das Neves Pereira e colaboradores, destacou-se a menor ocorrência de metástase em mulheres e em indivíduos com idade inferior a 40 anos, conferindo melhor prognóstico a este subgrupo de pacientes³⁰.

A literatura indexada não oferece dados robustos acerca da ocorrência de metástase sistêmica em pacientes com carcinóides típicos, porém relata-se que esta ocorrência varia de 0.5 a 2%^{18,54}.

Os índices de sobrevivência global para pacientes portadores de CT com 5 e 10 anos de acompanhamento são de 87 a 100%⁵⁴ e 82% respectivamente⁴⁹.

Não existe fator etiológico identificado que tenha direta relação com a transformação da célula neuroendócrina e com o desenvolvimento dos carcinóides broncopulmonares. Não há correlação descrita com tabagismo e com fatores ambientais⁵⁵.

1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Atelectasias em decorrência de estenoses ou compressões das vias aéreas são descritas em ate 70% dos casos em algumas séries⁵⁶.

Nesses casos, as manifestações clínicas mais comuns incluem: hemoptise, dor torácica, pneumonia recorrente e dispnéia em até 40% dos pacientes^{49,57}.

O diagnóstico de carcinóide broncopulmonar é feito com o diagnóstico de Síndrome Carcinóide Maligna em raros casos⁵⁸. A incidência desta síndrome em carcinóides típicos broncopulmonares é menor que 1% e geralmente está associada a tumores com mais de 5 cm de diâmetro ou a metástases hepáticas^{53,59,60}.

A liberação excessiva de substâncias biologicamente ativas que incluem Insulina, Gastrina, Hormônio Adreno Córtico-Trófico (ACTH), Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP), Glucagon e Serotonina (5-HT) desencadeiam esta síndrome⁶⁰⁻⁶².

Pode-se realizar o diagnóstico desta síndrome através da dosagem sérica ou urinária de Serotonina ou pela pesquisa na urina do Ácido 5-Hidroxiindoleacético (5-HIAA), um dos metabólitos da Serotonina⁵⁸.

1.6 TRATAMENTO DOS TUMORES CARCINÓIDES BRONCOPULMONARES

1.6.1 Tratamento cirúrgico

Classicamente os tumores carcinóides são tratados com a ressecção cirúrgica⁶³, variando-se da enucleação, ressecções em cunha e até mesmo lobectomias para os tumores carcinóides típicos⁶⁴⁻⁶⁷ às ressecções da região

de drenagem linfática partilhada com a lesão nos tumores carcinóides atípicos^{68,69}.

No entanto, constata-se que mesmo as lesões bem diferenciadas (CT) podem suscitar disseminação de metástases por via linfática e hematogênica em até 15% dos casos, proporcionando mortalidade de até 10% em 5 anos^{9,11,12,52,53}.

Tal evento desafia pesquisadores, clínicos e cirurgiões a identificarem pacientes com tumores carcinóides típicos com real potencial de malignidade e a predizerem o risco individual de metástases, com o objetivo de propor abordagens terapêuticas mais eficientes e personalizadas. Ou, em outras palavras, individualizar a conduta cirúrgica com auxílio de biomarcadores teciduais, variáveis clínicas, anátomo-patológicas, epidemiológicas e outras variáveis preditoras de risco para metástases^{30,70}.

Discute-se, por exemplo, o papel de ressecções cirúrgicas ampliadas ou até mesmo o uso de terapias adjuvantes, como a microrradioterapia intracelular com lutécio acoplado a análogos de somatostatina neste eventual subgrupo de pacientes com elevado risco de disseminação^{71,72}.

Entretanto, ainda hoje, aceita-se a ressecção econômica (enucleação, ressecção em manga ou em cunha), sem que os linfonodos hilares ou do mediastino sejam abordados para o tratamento do carcinoma neuroendócrino bem diferenciado (CT)⁶⁶.

Enquanto a maioria dos serviços sugere esta abordagem cirúrgica conservadora, observa-se disseminação da doença em pequena parcela de pacientes.

Para que haja concordância entre a classificação e a conduta, ou incorre-se no risco de considerar todos os CT como adenomas (poupando todos os doentes de ressecção linfática e lobectomia), ou no risco de submeter todos os doentes com lesões pouco agressivas a procedimentos ampliados desnecessários, em alguns casos com morbidade adicional; ou então, deve-se determinar um método capaz de diagnosticar qual o paciente portador de tumor carcinóide típico com real potencial de malignidade e pior prognóstico, predizendo o risco individual para a ocorrência de invasão ou metástases.

Assim, o conceito de que tumores carcinóides bem diferenciados (CT) podem ter comportamento agressivo exige que no momento do diagnóstico defina-se em que grupo prognóstico o paciente se encontra e proceda-se ao tratamento cirúrgico com extensão adequada.

Com relação aos outros carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares, que não os tumores carcinóides típicos, é bem definido que possuem maior potencial invasivo e metastático⁷³.

O comportamento dos tumores carcinóides atípicos é mais agressivo, gerando metástases para linfonodos do mediastino de 30 a 50% dos casos, justificando as ressecções cirúrgicas com maior extensão e agressividade, portanto^{10,32,33,73,74}.

Entre os métodos utilizados para a determinação de subgrupos de tumores com maior grau de agressividade, encontram-se as técnicas imunohistoquímicas⁷⁵ para detecção de moléculas envolvidas em fenômenos relacionados ao fenótipo maligno e também as técnicas de

quantificação da densidade de fibras da matriz extracelular³² que interferem com o potencial invasivo e metastático^{76,77}. Dados imunohistoquímicos e morfométricos da matriz extracelular poderiam ser utilizados como covariáveis independentes em um modelo de predição individual de eventos binários, entre eles, a ocorrência de metástase.

Moléculas intracelulares envolvidas no processo mitótico, como a proteína nuclear Ki-67⁷⁸, no processo de perda do controle da atividade transcripcional, como a proteína p53 ou com a capacidade da célula entrar em apoptose, como as proteínas citoplasmáticas Bcl-2 e Bax, podem ser detectadas e quantificadas pela técnica de imunohistoquímica. Assim também, macromoléculas que compõem a matriz extracelular podem ser detectadas e sua quantidade mensurada, como as fibras do sistema colágeno e as moléculas do sistema de fibras elásticas⁷⁰.

1.6.2 Quimioterapia

Não existem estudos randomizados na literatura indexada avaliando o papel e a eficiência da quimioterapia em tumores carcinóides broncopulmonares. Sabe-se, entretanto, que a quimioterapia não é uma modalidade de tratamento eficiente no combate de tumores carcinóides.

A eficiência de um tratamento quimioterápico é avaliada pela taxa de resposta (definida como a fração de pacientes de determinada população de estudo que obteve redução das dimensões do tumor, avaliada por exame físico, radiológico ou cintilográfico), pelo ganho em tempo de sobrevivência em decorrência do tratamento, pela toxicidade desencadeada (que deve ser

a menor possível) e, finalmente, pela qualidade de vida proporcionada ao doente. O tratamento quimioterápico em tumores carcinóides produz taxas de resposta global pequenas, nunca superiores a 35%, ausência de benefício em tempo de sobrevivência global e elevados índices de toxicidades em pacientes portadores de tumores carcinóides metastáticos, bem como reduzido controle dos sintomas decorrentes da Síndrome Carcinóide^{79,80}.

As drogas utilizadas para a abordagem desta doença são basicamente Cisplatina, Etoposideo, 5-Fluorouracil, Streptozocin, Dacarbazina e Epirubicina⁸¹.

No entanto, a quimioterapia sistêmica pode acrescentar benefícios em variantes mais agressivas de tumores neuroendócrinos. A combinação de Cisplatina e Etoposideo, regime quimioterápico utilizado no tratamento de Carcinoma de pulmão de pequenas células, foi testada em estudo clínico. Respostas globais de até 60% foram obtidas. Pacientes com tumores neuroendócrinos com baixo índice proliferativo (avaliados em análise de subgrupo) não responderam de forma semelhante a esta combinação de quimioterápicos⁸².

Considerando-se as toxicidades importantes observadas, diminuição da qualidade de vida dos pacientes, as discretas taxas de respostas e a ausência de benefício em tempo de sobrevivência global, esta modalidade terapêutica não se torna atrativa para o combate de tumores carcinóides.

1.6.3 Radioterapia

O emprego de radioterapia no combate aos tumores carcinóides não foi extensivamente estudado. Não existem estudos randomizados na literatura indexada avaliando eventuais benefícios da radioterapia no tratamento de carcinóides broncopulmonares, por exemplo. Alguns autores advogam o uso de radioterapia adjuvante em pacientes com diagnóstico de carcinóide atípico ou carcinoma neuroendócrino de grandes células com comprometimento de linfonodos regionais, em virtude do risco elevado de recorrência local. Por outro lado, não há recomendação de tratamento adjuvante em pacientes com tumores carcinóides broncopulmonares típicos⁸³.

Pode-se obter palição efetiva dos sintomas em pacientes portadores de metástases ósseas ou em sistema nervoso central com esta modalidade terapêutica, independente do tipo histológico^{2,83,84}.

1.7 SOMATOSTATINA

Um peptídeo inibidor da secreção do Hormônio de Crescimento foi originalmente descoberto de modo acidental na década de 60 do século passado, durante estudos da distribuição de GH-RH (Hormônio Liberador de Hormônio de Crescimento) no hipotálamo de ratos⁸⁵. A Somatostatina (SST) havia sido descoberta. Foi demonstrado, inicialmente, que se tratava de um peptídeo cíclico consistindo de 14 aminoácidos. Trabalhos subseqüentes

expandiram o rudimentar conceito de que a SST era um simples inibidor da secreção de GH-RH, reconhecendo que este hormônio possuía várias funções bioativas⁸⁶.

Atualmente, a SST é descrita como produto de uma família de múltiplos genes com dois similares subprodutos bioativos: Somatostatina-14 (SST-14) e Somatostatina-28 (SST-28), assim denominados em analogia ao número de aminoácidos em sua molécula^{86,87}.

A SST é sintetizada por células neuroendócrinas, neuronais, inflamatórias, imunes e tumorais, exercendo suas funções fisiológicas após a ligação com receptores de membrana plasmática específicos⁸⁸.

1.8 RECEPTORES DE SOMATOSTATINA e ANÁLOGOS DA SOMATOSTATINA

Estes receptores específicos de Somatostatina (SSTR) transmembrana foram identificados em tecidos normais de várias regiões do cérebro e leptomeninges, na pituitária anterior, no tecido pancreático endócrino e exócrino, na mucosa do trato gastrointestinal, bem como em células do sistema imune⁸⁹⁻⁹¹.

Cinco subtipos dos receptores de SST foram caracterizados. Estes subtipos, denominados SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4, SSTR-5, são codificados por genes não-alélicos diferentes, identificados nos

cromossomos 14, 17, 22, 20 e 16 respectivamente. São idênticos em 42 a 60% de sua sequência de aminoácidos^{92,93}.

Além disso, demonstram atividade estrutural e farmacológica distintas. Todos os cinco receptores pertencem à superfamília de receptores da proteína G, com sete domínios transmembrana alfa-helicoidais que estão acoplados ao nucleotídeo Guanina - Proteína G, como visualizado na Figura 1.

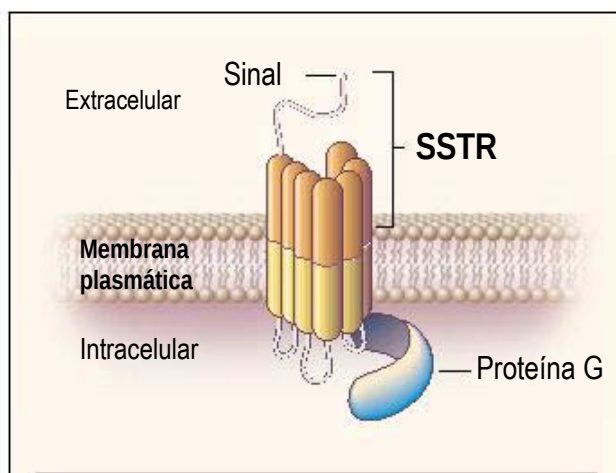


Figura 1: Modelo geral de receptor de SST acoplado a Proteína G. Receptores de SST pertencem à superfamília de receptores com sete domínios transmembrana. As letras do alfabeto Grego denotam as subunidades da proteína G ⁹⁴.

LEGENDA: SSTR: Receptor de Somatostatina

Apesar da Somatostatina possuir afinidade a todos os subtipos de SSTR, a afinidade é distinta a cada um dos subtipos. A maior afinidade é observada com o SSTR-2, uma vez que a concentração nanomolar de somatostatina necessária para ocupar 50% dos receptores SSTR-2 é a menor entre as necessárias para o mesmo objetivo nos demais receptores.

O SSTR-2, ademais, demonstrou ser o receptor com a maior afinidade aos análogos sintéticos de SST, como o Octreotide, Seglitida, Vapreotide e Lanreotide⁹⁵⁻⁹⁷.

A Tabela 1 demonstra que o SSTR-2 é o subtipo de receptor com maior afinidade a Somatostatina e aos seus análogos sintéticos.

Tabela 1 – Afinidade da Somatostatina e de seus análogos sintéticos aos subtipos de receptores. Valores nanomolares para ocupar 50% dos receptores. IC 50 (nM)

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
Somatostatina 14	2.3	1.3	2.1	4.1	2.2
Octreotide	>1000	2.1	35	>1000	5.6
Vapreotide	>1000	5.4	30.9	45	>1000
Lanreotide	>1000	1.8	43	66	>1000

Fonte: Cukiert A, Liberman B⁸⁹; Panetta R et al.⁹²

A identificação dos receptores em tecidos neoplásicos proporciona, de modo bem estabelecido, novas possibilidades para diagnóstico, estadiamento⁹⁸⁻¹⁰⁰ e terapias alvo com radionucleotídeos, por exemplo.

1.9 FISILOGIA DOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

Após a interação da Somatostatina com os SSTR-2 desencadeia-se a inibição da adenilciclase que resulta em diminuição dos níveis intracelulares de AMP cíclico e redução dos influxos de Ca^{+2} .

Além disso, a estimulação da atividade da enzima Tirosina Fosfatase impede a autofosforilação da enzima Tirosino Kinase (TK) na porção intracelular do receptor de EGF, inibindo sua ação e contribuindo para o processo antimitótico⁹⁴, como esquematizado na Figura 2

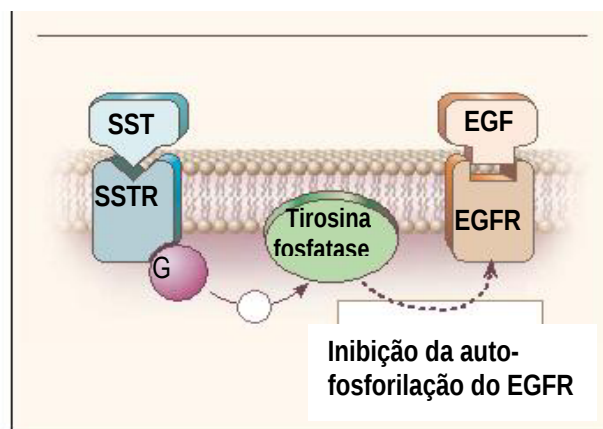


Figura 2: Ação anti-proliferativa da SST ⁹⁴

Assim, infere-se que se fosse possível anular todas as demais vias de sinalização celular (mecanismos de comunicação do meio extracelular com o núcleo) ao mesmo tempo em que existisse a interação do binômio SST-SSTR-2 notaria-se a inibição da proliferação celular e da angiogênese, parada do ciclo celular em G1 e indução da apoptose^{94,101-103}.

Sabe-se, ademais, que a interação da Somatostatina com cada um dos subtipos de receptores da Somatostatina pode desencadear efeitos intracelulares distintos⁹⁵, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo das características dos subtipos de SSTR humanos

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
Acoplamento com Proteína G	sim	sim	sim	sim	sim
Atividade de Adenilciclase	↓	↓	↓	↓	↓
Tirosina fosfatase	↑	↑	↑	↑↓	↑
Atividade de MAP K	↑	↑	↑↓	↑	↓
Atividade de Canais Ca	↓	↓	DESC	DESC	DESC
Parada ciclo celular em G1	↑	↑	DESC	↑↓	↑↓
Apoptose	↑	↑	DESC	DESC	DESC
Cromossomo	14q13	17q24	22q13,1	20p11,2	16p13,3
Distribuição tecidual	SNC Ilhotas Estômago Fígado Rim	SNC Ilhotas Estômago	SNC Ilhotas Estômago	SNC Ilhotas Estômago Pulmão	Ilhotas Estômago Hipófise

Fonte: Cukiert A, Liberman B⁸⁹

Legenda: DESC: Desconhecido; não determinado
 ↑: Aumento
 ↓: Redução
 SNC: Sistema nervoso central

Assim, presume-se que se os tumores carcinóides fossem privados das ações da Somatostatina apresentariam comportamento mais agressivo. Ou, se as membranas plasmáticas das células dos tumores carcinóides tivessem reduzida expressão dos receptores, ainda que em meio com concentração fisiológica de Somatostatina, poder-se-ia inferir que este clone neoplásico também apresentaria maior agressividade.

1.10 EXPRESSÃO DE SSTR EM NEOPLASIAS

As neoplasias também expressam receptores de somatostatina, principalmente os tumores neuroendócrinos¹⁰⁴. A Tabela 3 apresenta a expressão de receptores de Somatostatina em alguns tumores.

Tabela 3 – Expressão de receptores de somatostatina em tumores

	In Vivo	In Vitro
Tumor pituitário produtor de GH	70%	98%
Tumor pituitário produtor de TSH	100%	-
Gastrinoma	100%	100%
Insulinoma	61%	72%
Glucagonoma	100%	100%
APUDoma	89%	100%
Paraganglioma	100%	92%
Carcinoma Medular de Tireóide	71%	38%
Neuroblastoma	89%	65%
Feocromocitoma	86%	73%
Carcinóide (não pulmonar)	96%	88%
Câncer de pulmão de pequenas células	100%	57%

Fonte: Balon HR et al¹⁰⁵

O subtipo de receptor mais frequentemente expresso em tumores é o SSTR-2^{106,107}.

Não existe na literatura indexada descrição da expressão destes receptores em tumores carcinóides broncopulmonares.

1.11 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA SOMATOSTATINA

A Somatostatina não possui aplicabilidade como fármaco ou para o auxílio de métodos de propedêutica armada, em virtude de sua reduzida meia-vida (menor que 3 minutos). Assim, análogos sintéticos deste peptídeo com menor metabolização eram desejados. Desenvolveram-se, então, o Octreotide (Sandostatin, Novartis Pharmaceuticals Corp., East Hanover, NJ) que possui meia-vida de 2 horas e outros análogos sintéticos da SST como o Lanreotide, Vapreotide e Seglitide^{102,108,109}.

A afinidade destes análogos sintéticos pelos receptores, bem como as respostas intracelulares desencadeadas pela interação (inibição endógena da proliferação celular e da angiogênese, parada do ciclo celular em G1 e indução da apoptose) foram descritas como semelhantes à da Somatostatina^{92,95,101}.

1.12 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA SOMATOSTATINA E RADIONUCLÍDEOS.

1.12.1 Radionuclídeos

Os radionuclídeos são moléculas emissoras de radiação que podem ter aplicação em diagnóstico ou tratamento. Os radionuclídeos mais aplicados em CT e CA são Indium-111, Ytrio-90 e Lutécio-177.

O radionuclídeo Indium-111 possui meia-vida de 67 horas, emite radiação gama num raio menor que um diâmetro celular e seu efeito anti-proliferativo ocorre por lesão no DNA celular. É utilizado em diagnóstico e não tem eficiência no tratamento em virtude da baixa penetração radioativa. Ytrio-90, com vida média de 64 horas, emite radiação beta e tem aplicação anti-tumoral. Lutécio 177, por sua vez, emite radiações beta e gama, tem vida média mais longa (6,6 dias) e detém boa penetração em tumores de dimensões reduzidas¹¹⁰.

Tabela 4 – Características dos principais radionuclídeos aplicados em carcinóides típicos e atípicos

Radionuclídeo	½ vida	Radiação emitida	Eficiência terapêutica
Indium-111	67 horas	gama	Não
Ytrio-90	64 horas	beta	Sim
Lutécio-177	6,6 dias	gama e beta	Sim

Fonte: Buscombe JR¹¹⁰

1.12.2 Diagnóstico e estadiamento

OCTREOSCAN®

Com o propósito de identificar os tecidos que expressam SSTR através de método cintilográfico, uma molécula de radionuclídeo – 111-Indium-

dietilene-triamina ácido pentacético (111-In-DPTA) - foi adicionada ao Octreotide, criando-se desta forma o estudo conhecido como OctreoScan®.

O OctreoScan® (111-In-DPTA-Octreotide) é altamente sensível para a detecção de tumores carcinóides, variando entre 80 a 100%⁹⁸⁻¹⁰⁰ e possui alta afinidade ao SSTR-2 e ao SSTR- 5¹¹¹.

A eficiência deste método e também a justificativa para sua realização em virtude do elevado custo, no entanto, dependem da presença de Receptores de Somatostatina no tecido estudado. Desta forma, infere-se que se a expressão de receptores de somatostatina fosse determinada em carcinóides típicos broncopulmonares o OctreoScan® poderia tornar-se um método adicional para diagnóstico e estadiamento, bem como poderia predizer a eficiência de terapias alvo com análogos de SST acoplados a radionuclídeos.

Outro método de cintilografia que pode ser usado para a detecção de tumores carcinóides é o 111-In-DOTA-Lanreotide (DOTA-Lan) que utiliza o Lanreotide e mostrou-se 100% sensível para o diagnóstico de carcinóides pulmonares¹¹².

Os estudos cintilográficos com radioligantes acoplados aos análogos de SST podem completar o diagnóstico em situações clínicas em que o estudo radiológico é insuficiente. Sua capacidade de mapeamento de corpo total, ademais, qualifica o estudo a localizar metástases distantes ou doença multifocal, auxiliando no estadiamento inicial dos pacientes.

Além disso, o OctreoScan®, por exemplo, auxiliaria na determinação da conduta cirúrgica de eleição: conservadora ou com ressecção de linfonodos envolvidos se a expressão de SSTR-2 fosse confirmada em CT.

1.12.3 Tratamento com radionuclídeos – Terapia Alvo

Terapias alvo em oncologia são, por definição, modalidades terapêuticas que atuam somente nas células neoplásicas, poupando tecidos saudáveis e o paciente de toxicidades maiores. Neste sentido, acoplar um radionucleotídeo a uma molécula de análogo sintético de somatostatina poderia oferecer potencial terapêutico contra os tumores carcinóides, especialmente se receptores de Somatostatina do subtipo 2 fossem expressos, já que estes possuem maiores afinidades aos análogos sintéticos do peptídeo.

O binômio análogo sintético-radionucleotídeo seria injetado por via endovenosa e uma dose radioativa efetiva seria direcionada de modo seletivo ao tumor, desencadeando dano tumoral e induzindo apoptose¹¹³.

Atualmente, com a finalidade de aferir a presença de SSTR-2 em pacientes (o que possibilitaria abordagem terapêutica com análogos sintéticos acoplados a radionucleotídeos), alguns serviços preconizam o exame de OctreoScan®, apesar da ausência de evidências científicas que suportem esta particular aplicação. Infere-se que se a expressão de SSTR-2 fosse comprovada por imunohistoquímica em tumores carcinóides broncopulmonares típicos obter-se-ia método diagnóstico mais simples e de menor custo.

Octreotide marcado com 90-Yttrium (DOTATOC), Lanreotide acoplado com 90-Yttrium (DOTALAN) e Octreotate marcado com Lutécio 177 (177-Lu-DOTA- Try (3) Octreotate ou DOTATATE) são os binômios mais estudados e utilizados na prática clínica. Estão disponíveis para tratamento de tumores neuroendócrinos há mais de uma década⁸⁹.

São reportados resultados positivos com esta modalidade no tratamento de tumores neuroendócrinos. Por exemplo, Virgolini e colaboradores, da Universidade de Viena, realizaram o estudo “MAURITIUS” (Multicenter Analysis of a Universal Receptor Imaging and Treatment Initiative, an european Study), fase 2, utilizando o 90-Yttrium-DOTA – Lanreotide com finalidade terapêutica em 70 pacientes com tumores neuroendócrinos em progressão de metástase e que possuíam expressão de receptores de Somatostatina. Trinta e cinco por cento dos pacientes apresentaram doença estável e dez por cento resposta parcial (diminuição parcial do volume tumoral). Não foram relatadas toxicidades agudas ou crônicas de nenhuma espécie¹¹¹.

Foi realizada pesquisa clínica dirigida por Kwekkeboom e colaboradores, em centro da Holanda, empregando 177-Lu-DOTA-Try(3) Octreotate (Lutecio Octreotate) com 35 pacientes portadores de tumores neuroendócrinos gastrointestinais metastáticos com expressão de SSTR-2. Este composto tem afinidade 9 vezes superior pelo SSTR-2 quando comparado ao Octreotide. Respostas completas, definidas como ausência de tumor em método radiológico, foram verificadas em 3% dos pacientes, enquanto 35% apresentaram respostas parciais e 41% doença estável.

Progressão tumoral ocorreu em 21% dos pacientes. A resposta terapêutica correlacionou-se positivamente com a captação no OctreoScan® e com doença metastática limitada ao fígado⁴.

Considera-se que o 177-Lu-Dota-Tyr (3)-Octreotate é o mais promissor tratamento de pacientes com tumores neuroendócrinos com doença disseminada e que expressam SSTR-2, com índices de resposta global, definido como a somatória das taxas de respostas completas e parciais, ao redor de 80%¹¹⁴.

A determinação da expressão de receptores de somatostatina nos tumores carcinóides típicos broncopulmonares é fundamental para a viabilidade de estudos de imagem de maior sensibilidade que poderiam melhorar o estadiamento da doença, como por exemplo, o OctreoScan®. Por consequência, pacientes portadores de carcinóides típicos broncopulmonares poderiam ter a indicação de seu tratamento cirúrgico de modo individualizado, optando-se por ressecção tumoral ou dissecação dos linfonodos loco-regionais associada ao procedimento supracitado.

Além disso, a presença de SSTR-2 em carcinóides típicos poderia oferecer modalidade de terapia oncológica adicional, proporcionando, em tese, racional para tratamento com análogos sintéticos de somatostatina acoplados a radionuclídeos em pacientes sem condições de ressecabilidade ou com metástases hematogênicas.

OBJETIVOS DO ESTUDO

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

São objetivos do estudo verificar as seguintes hipóteses:

1. Se os tumores carcinóides típicos broncopulmonares expressam receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2).
2. Se existe relação entre a de expressão de SSTR-2 e a ocorrência de metástase linfática.
3. Se o SSTR-2 é uma variável independente preditiva do risco de metástase linfática.
4. Se o índice imunohistoquímico (Ie) do SSTR-2 é uma variável independente preditiva do risco de metástase linfática.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Em uma população de doentes tratados de tumor carcinóide típico broncopulmonar estudou-se variáveis independentes clínicas, anátomo-patológicas e biomoleculares por meio de estudo retrospectivo. Para tanto, realizou-se revisão dos prontuários e análise dos espécimes obtidos da ressecção tumoral.

O presente estudo (Protocolo de Pesquisa 2501/04/121) 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 11 de agosto de 2004, conforme documentação apresentada no apêndice B.

3.1. CASUÍSTICA

A presente casuística é constituída de 62 pacientes consecutivos operados para tratamento de tumores carcinóides típicos broncopulmonares no Hôpital Européen Georges Pompidou da Universidade Paris V, em Paris, na França e que foram seguidos por mais de cinco anos.

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 Departamento de Cirurgia Torácica do Hôpital Européen Georges Pompidou da Universidade Paris V.

Os dados obtidos foram: gênero, idade no momento do ato operatório, hemoptise, dor torácica, febre, pneumonias de repetição, emagrecimento em quilos, tosse, localização endoscópica do tumor em relação às vias aéreas superiores (central quando visível por fibroendoscopia ou periférico quando não visível por fibroendoscopia), maior diâmetro da lesão, carga tabágica, estadiamento TNM segundo a UICC¹¹⁵, ocorrência de metástases em linfonodos, bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia em relação ao total dissecado.

Dados de seguimento que eventualmente não constavam nos prontuários foram completados por meio da convocação dos pacientes, comunicação pessoal, visitas domiciliares ou questionários enviados por correio aos familiares enfocando dados relacionados à recidiva, metástase e óbito. Na eventualidade de se necessitar de atualização de dados de pacientes europeus, recorreu-se à consulta ao banco de dados da Assurance Maladie da Assistência Pública dos Hospitais Franceses, por meio do número de inscrição que consta na Carte Vitale.

Como critérios de inclusão, utilizou-se a confirmação do diagnóstico histológico do tumor primário, disponibilidade de dados referentes ao estadiamento TNM, seguimento de cinco anos completos e exame de tomografia computadorizada de tórax ao final desse período. Para a inclusão de pacientes que sofreram metástase, o período de seguimento mínimo foi o necessário para a detecção da metástase.

Considerou-se dado satisfatório para a determinação da presença de metástase em linfonodos no estadiamento inicial, a confirmação histológica do diagnóstico de carcinoma neuroendócrino à coloração tradicional pelo método da hematoxilina-eosina; e ausência, a descrição em prontuário, realizada por cirurgião torácico, da ausência de sinais, de sintomas ou de evidência do fenômeno em método de diagnóstico por imagem durante todo o período de seguimento desde o momento da ressecção cirúrgica para o tratamento do tumor primário até o último contato.

3.2. CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Foram coletados todos os espécimes histológicos dos tumores primários e dos linfonodos 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. Os blocos oriundos do departamento de Patologia do HC da FMUSP eram confeccionados com parafina de abelha até meados da década de 90 do século passado. Porém, não existe uma data limite para ser considerada como corte entre o período que utilizava parafina de abelha e de outra origem.

Cortes histológicos de 3 μ m 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. Nenhum dos patologistas conhecia o diagnóstico prévio referente às lâminas analisadas.

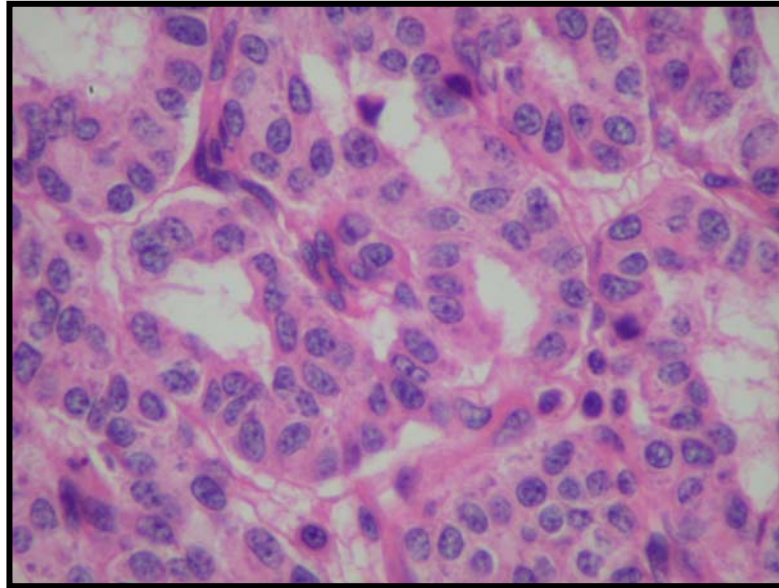


Figura 3 – Fotomicrografia de carcinóide bronco-pulmonar típico em coloração por Hematoxilina-eosina (400x) – caso 26

A classificação histológica do tipo de tumor neuroendócrino foi realizada a partir das áreas mais representativas, baseadas no padrão predominante, identificadas após análise de pelo menos 10 campos microscópicos a uma ampliação de 250x. Esta classificação obedeceu aos critérios propostos por Travis et al.⁴⁵, apresentados na Tabela 5, e que foram mantidos pelo consenso de 2004 da Organização Mundial de Saúde³¹.

Tabela 5 – Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos

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

FONTE: Travis WD et al.⁴⁵

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

Os casos nos quais o diagnóstico foi de proliferação neuroendócrina bem diferenciada com diâmetro inferior a 5 mm (*tumorlets*), ou de tumor carcinóide broncopulmonar atípico, ou de carcinoma de grandes células, ou de carcinoma de pequenas células, segundo classificação da Organização Mundial de Saúde de 2004³¹, foram excluídos do estudo.

As lâminas coradas apenas pelo método tradicional pela hematoxilina-eosina, relativas aos linfonodos ressecados, também foram analisadas pelos dois patologistas para verificação do acometimento. Da mesma forma, foram

incluídos somente os casos nos quais existiu necessariamente a concordância dos dois patologistas.

Após essa seleção, as lâminas obtidas a partir dos blocos referentes aos 62 pacientes recrutados foram preparadas para a marcação imunohistoquímica com o anticorpo primário para SSTR-2.

3.3. TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA EMPREGADA NA DETECÇÃO DOS ANTÍGENOS

Os blocos selecionados do tumor primário 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 sinalização: 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 protocolo¹¹⁶: 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 passo seguinte 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.

Diluiu-se, então, o seguinte anticorpo primário em Soro Albumina Bovina (BSA), Sigma: SSTR-2 (US Biological # S5331-52, CA, EUA), anticorpo IgG policlonal em diluição de 1:200.

Todas as lâminas foram cobertas com 100 µL 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 lavaram-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, EUA) 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 controles positivos, corados simultaneamente às reações descritas, utilizou-se fragmento de tecido de pâncreas, que é sabidamente positivo para o anticorpo primário. Para controle negativo, os mesmos cortes foram incubados com BSA, sem adição de anticorpo.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO ENCONTRADA

3.4.1. Determinação dos índices imunohistoquímicos (Ie)

As leituras das lâminas foram realizadas 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 técnicas de imunohistoquímica. Todas as lâminas foram examinadas em microscópio óptico em aumento de 100 e 400 vezes.

A coloração castanha de uma população celular em uma mesma lâmina onde havia células sem qualquer coloração (controle interno negativo) foi considerada como uma evidência da expressão do antígeno (SSTR-2) nas células coradas.

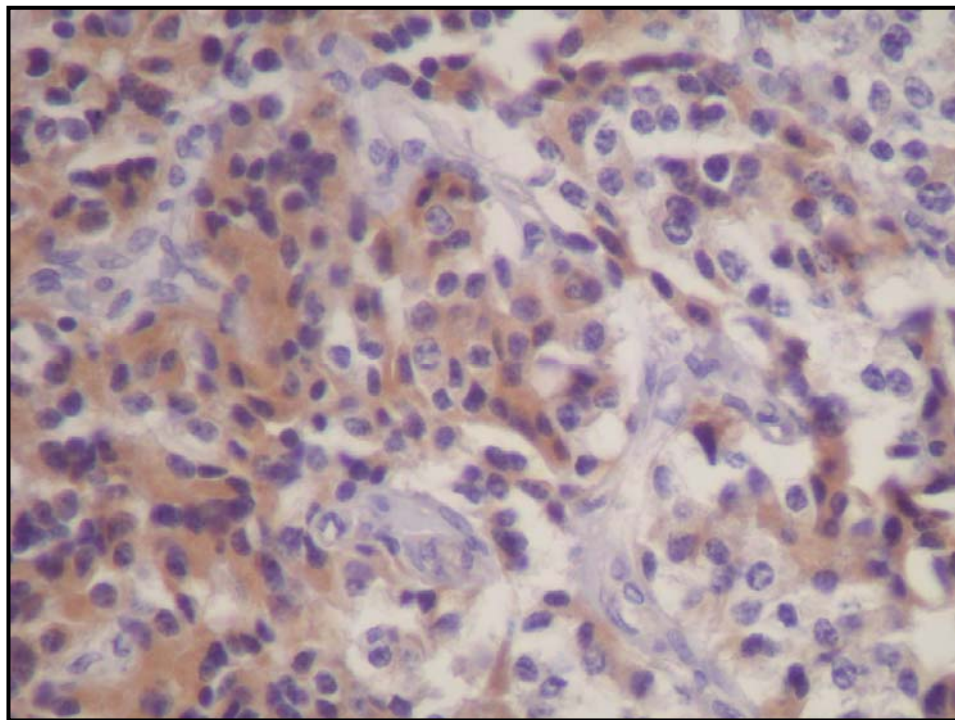


Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para SSTR-2 em aumento de 400x. Nota-se coloração nos citoplasmas das células neoplásicas (caso nº 58)

Foi realizada análise semi-quantitativa para a interpretação e quantificação dos resultados do método de imunohistoquímica. A leitura foi realizada em campos representativos (*“hot spots”*) – que são campos tingidos pelo reagente e selecionados para a quantificação. Toda a área do tecido submetido ao teste de imunohistoquímica foi estudada, afim de

localizar os “*hot spots*” mais representativos, acatando método vigente e aceito na literatura indexada¹¹⁷.

A quantificação constou da análise de duas variáveis de forma categórica, com intuito de determinar o índice de imunoexpressão. A primeira variável foi a porcentagem de área tingida com o marcador de SSTR-2 na amostra da lâmina (P%) e a segunda variável foi a intensidade (Int) da expressão com o marcador de SSTR-2.

Os valores de cortes para a determinação de categorias para as porcentagens de áreas tingidas nas amostras foram arbitradas como zero (ausência de imunoexpressão), 1 (imunoexpressão maior que zero e menor ou igual a 25% da área), 2 (imunoexpressão maior ou igual a 26% e menor ou igual a 50% da área) e 3 (imunoexpressão maior ou igual a 51% área da amostra).

Os valores de cortes para a determinação de categorias para a intensidade da expressão foram arbitrados como: zero (ausência de expressão), 1 (expressão pouco intensa), 2 (expressão de moderada intensidade) e 3 (expressão muito intensa).

O índice de imunoexpressão (Ie) foi calculado pela multiplicação da porcentagem pela intensidade e teve como valores possíveis: zero, um, dois, três, quatro, seis ou nove e graduou a imunoexpressão de SSTR-2,

Foram consideradas amostras com ausência de expressão de SSTR-2 (imunohistoquímica negativa) aquelas que não tiveram nenhum campo com coloração, cujo Ie foi igual a zero.

3.5. ORGANIZAÇÃO DOS DADOS

Os dados obtidos com a quantificação do marcador encontram-se dispostos na Tabela B1 – Anexo B. Esta, juntamente com a tabela encontrada no 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, hemoptise, dor torácica, febre, pneumonias de repetição, emagrecimento em quilos, tosse, localização endoscópica do tumor em relação às vias aéreas superiores (central quando visível por fibroendoscopia ou periférico quando não visível por fibroendoscopia), maior diâmetro da lesão, carga tabágica em anos/maço e estadiamento TNM segundo a UICC¹¹⁵, ocorrência de metástases em linfonodos, bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia em relação ao total dissecado.

3.6. MÉTODO PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com auxílio do programa Excell em Windows XP (Microsoft Corporation®, Califórnia, USA).

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 definidas como paramétricas ou não paramétricas segundo o programa estatístico SigmaStat[®] versão 3.0 (SPSS[®] Inc; Ilinois, USA). Para todas as outras análises utilizou-se o programa SPSS[®] versão 13.0 (SPSS[®] Inc; Ilinois, USA).

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua de distribuição paramétrica foram organizados e descritos através da média e do desvio padrão, para as não paramétricas a mediana e amplitude inter quartis. Para as categorizadas utilizaram-se freqüências absolutas e relativas.

Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais paramétricas, utilizou-se o teste “t” de Student, e entre as médias de três ou mais populações a análise de variância (ANOVA) com teste auxiliar de Bonferroni. Para as populações não paramétricas, a comparação das medianas foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Comparações da freqüência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas com aplicação do teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado de Pearson. A razão de chances foi utilizada como medida de risco para essas variáveis.

Para a verificação da existência de correlação entre duas variáveis contínuas, utilizou-se o teste de correlação de Pearson.

3.6.1. Predição de risco individual

A análise multivariada baseada no modelo de regressão logística em degraus foi empregada para identificar as variáveis independentes preditivas da ocorrência dos eventos binários e definir a magnitude de risco (β) para cada uma delas. O valor do exponencial neperiano de β para um fator de risco é a razão de chances para a ocorrência do evento binário.

Somente o biomarcador, as características clínicas e anátomo-patológicas que apresentaram correlação com o fenômeno binário à análise univariada são incluídos na análise multivariada.

Para variáveis independentes, a mesma análise foi aplicada para o estabelecimento da equação que permite o cálculo do risco da ocorrência de um evento binário. A equação é composta pelos valores β de cada variável independente e o valor de uma constante (β_0). O valor da constante permite calcular o risco do fenômeno binário para um indivíduo hipotético que não apresente nenhum dos fatores de risco estudados. A constante representa o risco determinado por variáveis independentes que não foram incluídas no estudo e aquelas que devem ainda ser descobertas.

O risco do evento binário para um indivíduo é calculado pela equação:

$$\text{Risco do evento binário} = 1/[1+e^{-(\beta_0+\beta_1.x_1+\beta_2.x_2+.....+\beta_n.x_n)}]$$

onde β_0 é a constante, β_1 é o coeficiente β específico para a variável 1, β_2 é o coeficiente β específico para a variável 2, e assim por diante. Os fatores x_1 ,

$x_2, \dots, x_n$ são os valores medidos das respectivas variáveis para cada indivíduo. E "e" é a constante de Neper.

Quando for possível a obtenção da equação de risco, essa foi representada pela curva logística.

Para todos os testes empregados adotou-se o valor de significância estatística menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados foram apresentados em 3 partes: a primeira foi a estatística descritiva da casuística geral quanto às características clínicas pré-operatórias. Alguns resultados das comparações entre as frequências e entre as médias desta casuística também foram apresentados (análise univariada).

Na segunda parte foram apresentados os padrões de expressão imunohistoquímico e do Índice de Imunoexpressão do SSTR-2 e na terceira e última o resultado da análise multivariada para a predição do evento metástase linfática.

4.1. ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Os dados clínicos e histopatológicos de toda a casuística são apresentados na Tabela A1 no Anexo A.

O estudo incluiu 62 pacientes e a idade variou entre 1 e 77 anos, com média de 47,04 anos; desvio padrão de 15,8 anos com intervalo de confiança de 95% do erro da média igual a 2 anos.

A distribuição dos pacientes de acordo com o gênero, conforme esquematizado na Figura 5 foi: 23 pacientes do gênero masculino (37,1%) e 39 do feminino (62,9%).

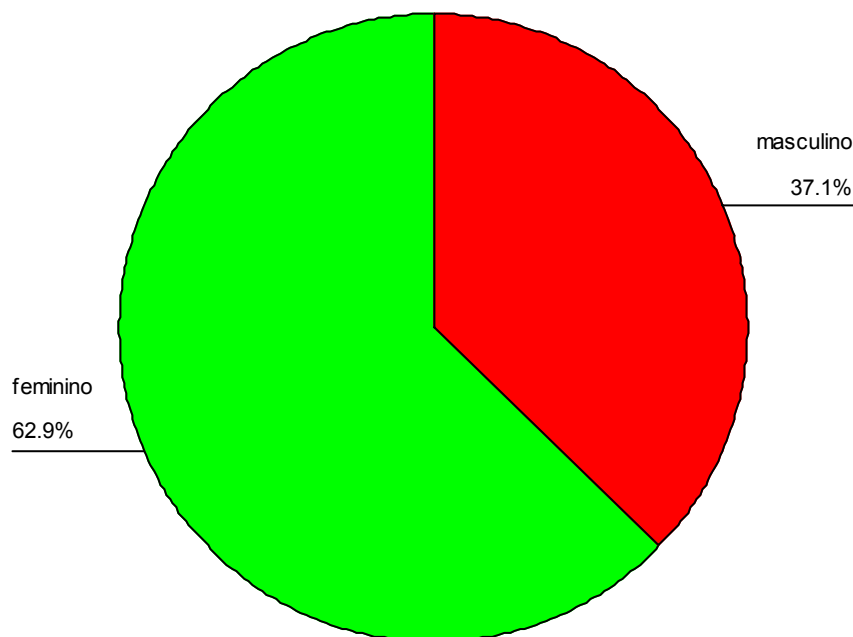


Figura 5 – Gráfico da distribuição dos pacientes de acordo com o gênero

A distribuição dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de sintomas foi: 23 pacientes tinham sintomas pré-operatórios (37,1%) e 39 não (62,9%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de tosse foi: 14 pacientes apresentaram tosse (22,6%) e 48 não (77,4%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de hemoptise foi: 8 pacientes apresentaram hemoptise (12,9%) e 54 não (87,1%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de dispnéia foi: 3 pacientes apresentaram dispnéia (4,8%) e 59 não (95,2%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de dor foi: 5 pacientes apresentaram dor (8,1%) e 57 não (91,9%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de febre foi: 7 pacientes tiveram febre (11,3%) e 55 não (88,7%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de infecção foi: 16 pacientes tiveram infecção (25,8%) e 46 não (74,2%).

A distribuição dos pacientes segundo a presença ou ausência de emagrecimento foi: 3 pacientes tiveram emagrecimento (4,8%) e 59 não (95,2%).

A distribuição dos tumores segundo a presença ou ausência de metástase linfática foi: 13 (20,9%) apresentaram metástase linfática e 49 (79,1%) não.

A média de linfonodos dissecados por paciente foi de 6,5 linfonodos, com desvio padrão de 3,9 e com intervalo de confiança de 95% do erro da média igual a 0,5. O mínimo de linfonodos dissecados por paciente foi de um em um paciente e o máximo foi de 24 em 1 paciente; a moda foi de cinco linfonodos em 18 pacientes.

A média do número de linfonodos positivos à análise da presença de células neoplásicas, por paciente, foi de 0,3; o desvio padrão de 0,7; com intervalo de confiança de 95% do erro da média igual a 0,09. O mínimo foi de nenhum dos linfonodos analisados ser positivo para células neoplásicas em 49 pacientes e o máximo foi de 4 linfonodos positivos entre os analisados em 1 paciente.

A distribuição dos tumores segundo a presença ou ausência de metástase hematogênica foi: 56 (90,3%) pacientes sem metástase hematogênica e 6 (9,7%) com metástase hematogênica.

A média do diâmetro do tumor no maior eixo foi de 27 mm, com desvio padrão de 14 mm, e intervalo de confiança de 95% do erro da média igual a 1,7 mm. O menor tumor teve diâmetro de 6 mm e o maior de 60 mm.

A média da carga de tabagismo acumulada foi de 11,5 anos/maço, com desvio padrão de 18,1 anos/maço e intervalo de confiança de 95% do erro da média foi de 2,3 anos/maço. Valor negativo de anos/maço não tem significado clínico.

A distribuição da localização do tumor quanto à posição central ou periférica, conforme esquematizado na Figura 6 foi: 18 pacientes tiveram tumores periféricos (29%), ao passo que 44 tiveram tumores centrais (71%).

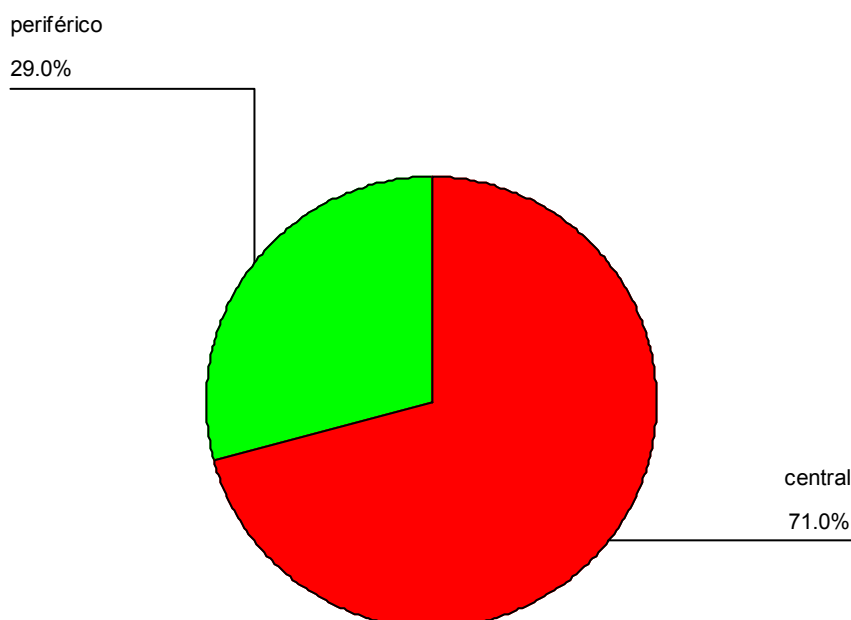


Figura 6 – Gráfico da distribuição dos pacientes de acordo com a localização do tumor

4.2. COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS E ENTRE AS MÉDIAS DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRÉ-OPERATÓRIAS

4.2.1. Comparação das médias de idade (com o intervalo de confiança do erro da média em 95%) segundo o gênero

Para a comparação das médias de idade (com intervalo de confiança do erro da média em 95%) segundo o gênero foi realizado o teste *t* de Student.

Não houve diferença estatística ($p=0,755$), conforme esquematizado na Figura 7.

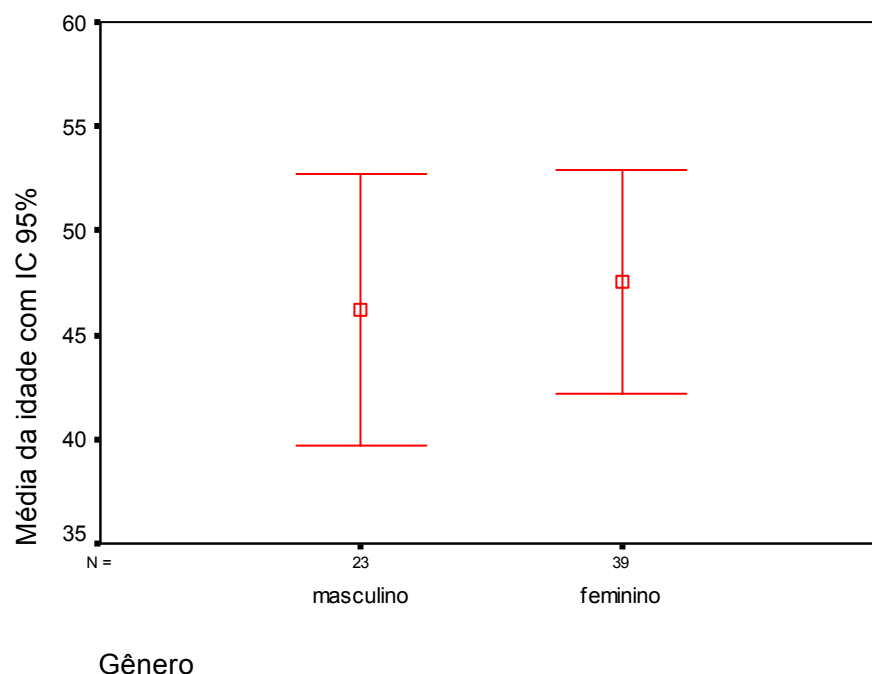


Figura 7 – Gráfico da comparação entre as médias de idade segundo o gênero

4.2.2. Comparação das médias de idade segundo a ocorrência de metástase linfática

Para a comparação das médias de idade segundo a ocorrência de metástase linfática foi realizado o teste t de Student.

Não houve diferença estatística ($p=0,410$).

4.2.3. Comparação da ocorrência de metástase linfática segundo o gênero

Para a comparação da frequência de metástase linfática segundo o gênero foi realizado o teste exato de Fisher, sob a hipótese de que homens têm o maior risco de metástase linfática que mulheres.

Há diferença bruta, mas sem significância estatística ($p=0,140$ unicaudado).

4.2.4. Comparação da ocorrência de metástase linfática segundo a presença ou ausência de sintomas

Para a comparação da ocorrência de metástase linfática segundo a presença ou ausência de sintomas foi realizado o teste exato de Fisher

Há diferença bruta, mas sem significância estatística ($p=0,525$).

4.2.5. Comparação da frequência de metástase linfática segundo a presença ou não de emagrecimento

Para a comparação da frequência de metástase linfática segundo a presença ou não de emagrecimento foi realizado o teste exato de Fisher.

Não houve diferença estatística ($p=0,487$ unicaudado).

4.2.6. Comparação da frequência de metástase linfática segundo a posição central ou periférica do tumor

Para a comparação da frequência de metástase linfática segundo a posição central ou periférica do tumor foi, sob a hipótese de maior agressividade do tumor periférico, realizado o teste exato de Fisher.

Houve diferença estatística ($p=0,034$ unicaudado).

4.2.7. Comparação das médias de idade segundo a posição central ou periférica do tumor

Para a comparação das médias de idade segundo a posição central ou periférica (sob a hipótese de que os tumores periféricos poderiam ser característicos de pessoas mais velhas)

Houve diferença estatística significativa ($p=0,003$)

4.2.8. Comparação da frequência de metástase hematogênica segundo a ocorrência de emagrecimento

Para a comparação da frequência de metástase hematogênica segundo a ocorrência de emagrecimento, como variável binária, foi realizado o teste exato de Fischer.

Houve diferença estatística significativa ($p=0,001$).

4.3. COMPARAÇÃO DE MEDIANAS

As variáveis contínuas tabagismo em anos/maço, maior diâmetro do tumor, índice de imunohistoquímica e quantidade de linfonodos dissecados não tiveram uma distribuição paramétrica, segundo o teste de Kolgomorov-Smirnov em correção de significância de Lilliefors.

4.3.1. Comparação de medianas entre os grupos com e sem metástase linfática

Não houve diferença entre as medianas de tabagismo em anos/maço ($p=0,11$; teste de Mann-Whitney), maior diâmetro do tumor ($p=0,77$; teste de Mann-Whitney) e Índice de expressão imunohistoquímica ($p=0,66$; teste de Mann-Whitney) entre os grupos de paciente com e sem metástase linfática.

4.3.2. Comparação de medianas entre os grupos com e sem metástase hematogênica

Não houve diferença entre as medianas de tabagismo em anos/maço ($p=0,26$; teste de Mann-Whitney), maior diâmetro do tumor ($p=0,42$; teste de Mann-Whitney) e Índice de expressão imunohistoquímica ($p=0,40$; teste de Mann-Whitney) entre os grupos de pacientes com e sem metástase hematogênica.

4.4. PADRÕES DE EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICO E DO ÍNDICE DE IMUNOEXPRESSÃO DO SSTR-2

4.4.1. Distribuição dos tumores segundo a imunoexpressão de SSTR-2

A distribuição dos tumores segundo a presença ou ausência do SSTR-2 foi: 36 pacientes tinham tumores que expressavam SSTR-2 (58,1%), enquanto 26 doentes tinham tumores que não expressavam SSTR-2 (41,9%), conforme representado na Figura 8.

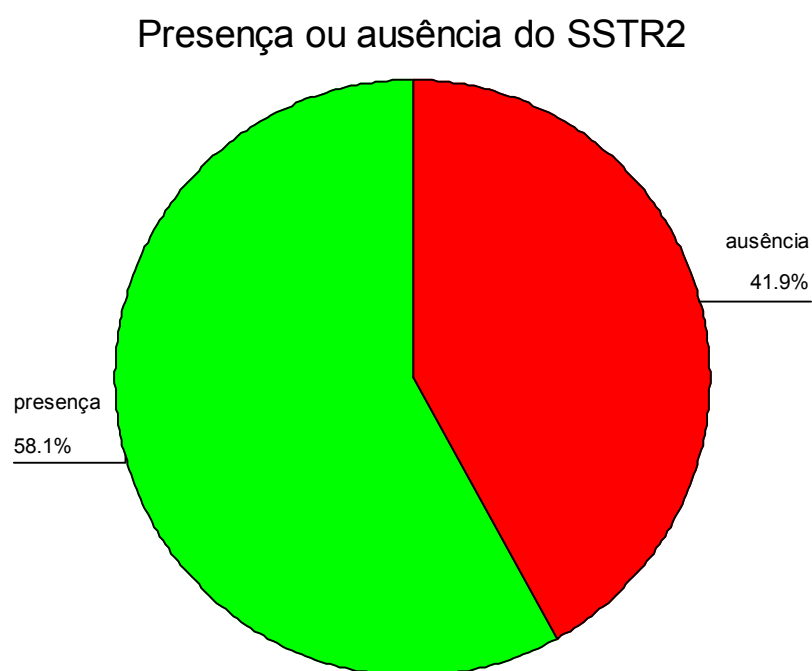


Figura 8 – Gráfico da porcentagem de casos com presença ou ausência do SSTR-2

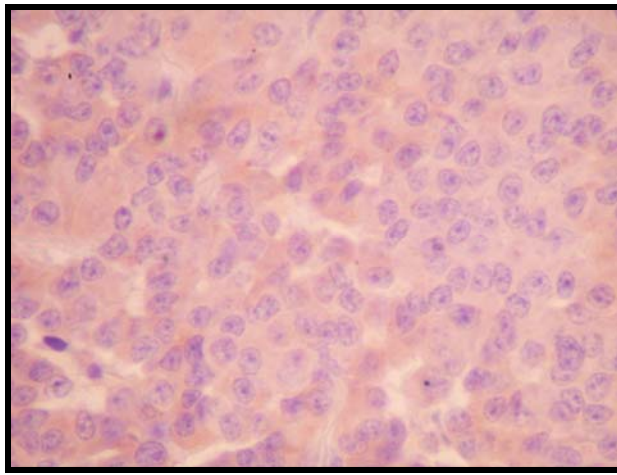


Figura 9 – Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcagem de SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 15: Índice de imunoexpressão = 0)

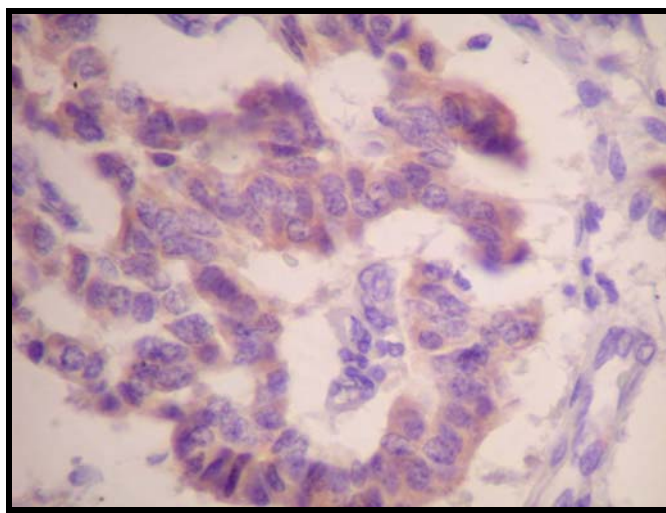


Figura 10 – Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcagem de SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 26: Índice de imunoexpressão = 3)

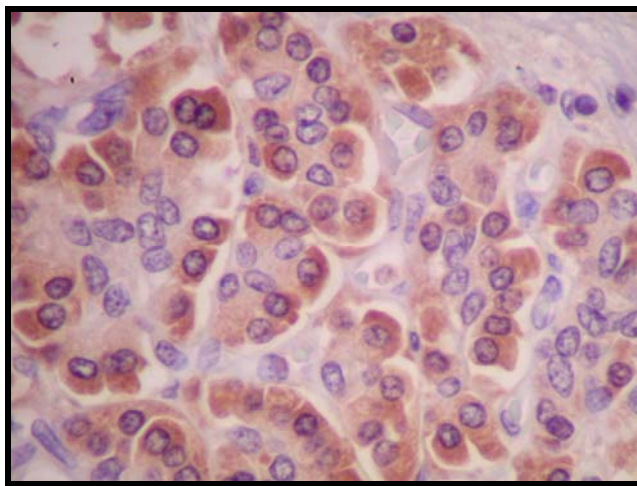


Figura 11 – Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcagem de SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 19: Índice de imunoexpressão = 6)

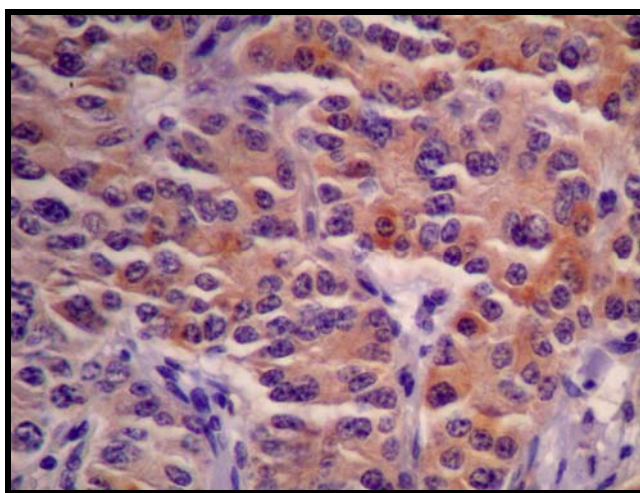


Figura 12– Fotomicrografia em aumento de 400x da imunomarcagem de SSTR-2 em carcinóide típico broncopulmonar (caso número 56: Índice de imunoexpressão = 9)

4.4.2. Distribuição das variáveis categóricas para a quantificação das Porcentagens (P%) de área tingidas com o marcador de SSTR-2 na amostra das lâminas dos pacientes e distribuição da quantificação da Intensidade (I) de imunomarcação com SSTR-2 na amostra das lâminas dos pacientes

A distribuição das variáveis categóricas para a quantificação das porcentagens de área tingidas com o marcador de SSTR-2 na amostra das lâminas dos pacientes e distribuição da quantificação da intensidade de imunomarcação com SSTR-2 na amostra das lâminas dos pacientes estão organizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição das variáveis categóricas da quantificação de porcentagens e intensidade de SSTR-2

Variável categórica	ZERO	UM	DOIS	TRÊS
Intensidade (# pts)	26	8	20	8
Porcentagem (# pts)	26	14	12	10

LEGENDA: # pts – número de pacientes

4.4.3. Distribuição dos valores do Índice de Imunoexpressão (Ie)

A distribuição dos valores do Ie está organizada na Tabela 7.

Tabela 7 – A distribuição dos valores do Ie

Índice de Imunoexpressão (Ie)	ZERO	UM	DOIS	TRÊS	QUATRO	SEIS	NOVE
# pts	26	4	11	3	7	7	4

Legenda: # pts - número de pacientes

4.4.4. Comparação da frequência de metástase linfática segundo a presença de receptores SSTR2

Para a comparação da frequência de metástase linfática segundo a presença de receptores SSTR2, como variável binária, foi realizado o teste exato de Fisher.

Não houve diferença estatística ($p=0,529$).

4.4.5. Média do índice de expressão do SSTR-2

A média do índice de imunoexpressão foi de 2,2, com desvio padrão de 2,6 e o intervalo de confiança do erro da média foi de 0,3.

4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE MULTIVARIADA

Quanto aos resultados da análise multivariada pelo método de regressão logística, analisou-se separadamente aqueles relativos à predição de metástase linfática.

4.5.1. Predição de metástase linfática

4.5.1.1. SSRT-2 como variável binária: presença ou ausência

Primeiramente foi verificado se a simples presença ou ausência do SSRT-2, sem considerar nem a intensidade nem a porcentagem de células imuno marcadas, seria uma variável independente preditiva da ocorrência da metástase linfática.

As variáveis independentes inseridas no modelo de predição de metástase linfática como sendo candidatas a predizerem o fenômeno foram as seguintes:

1. gênero masculino: variável binária sob a hipótese de que homens tem mais metástase linfática que mulheres.
2. idade como variável continua: sob a hipótese de que a cada ano o risco aumentaria.
3. presença de emagrecimento como variável binária: sob a hipótese de que a presença de emagrecimento pudesse predizer a metástase linfática.

4. tabagismo em anos/maço: sob a hipótese de que quanto maior a carga de tabagismo acumulada, maior o risco de ter o tumor carcinóide que envia metástase linfática.
5. posição periférica do tumor: sob a hipótese de que tumores periféricos têm maior potencial de causar metástase.
6. presença do receptor SSRT-2 como variável binária.

A Tabela 8 mostra o valor da significância estatística da relação de cada variável independente com o evento binário “metástase linfática” ainda sem estarem inclusas na equação logística.

Observa-se que a presença do SSTR-2, mesmo quando analisada preliminarmente, não é uma variável independente relacionada ao fenômeno de metástase linfática. Desta forma, essa variável não é candidata a ser preditiva, e não será inclusa no modelo de regressão logística.

Tabela 8 – Variáveis independentes não inclusas na Equação (“step” 0)

	Score	gl	p
Gênero masculino	1,977	1	0,160
Idade em anos	0,703	1	0,402
Presença de emagrecimento	0,836	1	0,360
Tabagismo em anos/maço	4,859	1	0,027*
Posição periférica	4,916	1	0,027 *
Diâmetro do tumor em mm	0,020	1	0,887
Presença do receptor SSTR2	0,842	1	0,359

gl = graus de liberdade

* = significância estatística

A Tabela 9 mostra que há uma equação logística que inclui algumas das variáveis independentes incluídas no modelo como candidatas a preditivas e que predigam o fenômeno binário da ocorrência de metástases com maior verossimilhança que um modelo nulo, em que hipoteticamente não haja qualquer variável independente preditiva do evento.

Tabela 9 – Variáveis independentes incluídas no modelo (“step” 0)

	Coeficiente β	Erro padrão	Wald	gl	p	Exp (β)
Constante	-1.327	0,312	18.088	1	0,000	0,265

gl = graus de liberdade
Exp (β) = exponencial de β

A tabela 10 mostra como seriam classificados os dados segundo a concordância entre o fenômeno observado, no caso a metástase linfática, e o predito pela equação nula, ou seja, sem a utilização de variáveis independentes preditivas. Como o risco de metástase linfática na casuística foi menor que 50%, a equação nula não prediz quais são os pacientes que poderiam ter esse tipo de evento biológico.

Tabela 10 – Classificação de concordância entre observado e predito segundo a equação nula (“Step”0)

Observado	Predito		Porcentagem de concordância
	Sem metástase	Com metástase	
Sem metástase	49	0	100
Com metástase	13	0	0
Porcentagem de concordância geral			79

A Tabela 11 mostra a classificação dos dados segundo a concordância entre o fenômeno observado e o predito de acordo com duas equações logísticas propostas. O corte para a classificação entre predito ou não predito é o risco maior ou menor que 50%, mas não leva em conta se o erro para predição foi entre o 50% e o 49,9%, ou se foi um erro de predição da magnitude entre o 50% e o zero.

A primeira equação (“step” 1) incluiu a posição periférica como variável independente preditiva do evento metástase linfática. Porém, mesmo com a inclusão dessa variável, a porcentagem de concordância entre o predito e o observado foi de 79%, valor já alcançado pela equação nula.

A segunda equação (“step” 2) incluiu, além da posição periférica, uma segunda variável preditiva, o tabagismo quantificado em anos/maço. A porcentagem de concordância entre o observado e o predito na equação proposta no segundo degrau (“step” 2) foi de 82,3%.

Tabela 11 – Classificação de concordância entre observado e predito segundo a primeira e a segunda equações propostas que contêm variáveis independentes preditivas de metástase linfática

	Observado	Predito		Porcentagem de concordância
		Sem metástase	Com metástase	
“step” 1	Sem metástase	49	0	100
	Com metástase	13	0	0
PCG				79
“step” 2	Sem metástase	48	1	98
	Com metástase	10	3	23
PCG				82

PCG = porcentagem de concordância geral

Na tabela 12 observa-se que existem duas variáveis independentes preditivas do evento binário metástase linfática. Na equação proposta no primeiro degrau foi utilizado como variável preditiva a posição periférica do tumor. Na equação proposta no segundo degrau, foram identificadas duas variáveis independentes como preditivas de metástase linfática; a posição periférica e a carga de tabagismo acumulada em anos/maço.

A razão de chances de um paciente com tumor periférico ter metástase linfática sobre um paciente com tumor central não ter foi de aproximadamente 4,5, podendo variar num intervalo de confiança à 95% entre 1,1 a 17, 5.

A razão de chances de um paciente que fuma ou fumou mais ter metástase linfática sobre de um paciente que nunca fumou ou fumou menos não ter foi de aproximadamente 1,036 a cada ano/maço, podendo variar de 1,001 a 1,072 por ano/maço.

Tabela 12 – Razão de chances da ocorrência de metástase linfática (Exp(B)) referente às variáveis independentes preditivas do fenômeno em duas equações logísticas propostas: com uma (“step” 1) e com duas variáveis (“step” 2)

		β	Erro padrão	Wald	gl	Sig.	Exp(β)	95% C.I. para EXP(β)	
								menor	maior
“step” 1	Posição periférica	1,394	0,653	4,553	1	0,033	4,030	1,120	14,501
	Constante	-1,846	0,439	17,655	1	0	0,158		
“step” 2	Tabagismo (ano/maço)	0,035	0,017	4,113	1	0,043	1,036	1,001	1,072
	Posição periférica	1,494	0,699	4,562	1	0,033	4,453	1,131	17,534
	Constante	-2,374	0,556	18,241	1	0	0,093		

“step” 1: Posição periférica.

“step” 2: Tabagismo em ano/maço.

gl= graus de liberdade

Exp β = exponencial β

Desta forma, o SSTR-2 não foi uma variável independente preditiva do evento metástase linfática.

4.5.1.2. SSRT-2 como variável categórica

Apos a verificar a hipótese de que a presença ou ausência do receptor SSRT-2 seria uma variável independente preditiva da ocorrência da metástase linfática, procedeu-se à verificação da hipótese de que o Índice de imuno expressão poderia estar relacionado com o fenômeno biológico.

As variáveis independentes inseridas no modelo de predição de metástase linfática como sendo candidatas a predizerem o evento foram as seguintes:

1. gênero masculino: variável binária sob a hipótese de que homens tem mais metástase linfática que mulheres.
2. idade como variável continua: sob a hipótese de que a cada ano o risco aumentaria.
3. presença de emagrecimento como variável binária: sob a hipótese de que a presença de emagrecimento pudesse predizer a metástase linfática.
4. tabagismo em anos/maço: sob a hipótese de que quanto maior a carga de tabagismo acumulada, maior seria o risco de metástase linfática.
5. posição periférica do tumor: sob a hipótese de que tumores periféricos teriam maior potencial de causar metástase.
6. o Índice de imunoexpressão do receptor SSRT-2 como variável categórica ordinal: sob a hipótese de que tumores bem diferenciados possuiriam maior Índice de imuno expressão do receptor, seriam menos agressivos e também teriam menor potencial de causar metástases.

Concluiu-se, após a análise multivariada das variáveis independentes que o índice de imunoexpressão do SSTR-2 não foi uma variável independente preditiva do evento metástase linfática.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A discussão foi realizada em quatro partes. A primeira discorreu sobre as limitações do trabalho, a segunda sobre o espectro das proliferações neuroendócrinas, a terceira sobre os resultados dispostos no capítulo de Resultados, e somente então, prosseguiu-se com a discussão da importância clínica e da aplicabilidade da expressão dos receptores de Somatostatina tipo 2 em tumores carcinóides broncopulmonares.

5.1. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Para que se possa iniciar qualquer discussão sobre os resultados, foi imperativo determinar as limitações do estudo, para evitar análise de dados que não representem a realidade. Assim, seguem abaixo as principais limitações do trabalho constatadas:

1. A dissecação dos linfonodos durante o procedimento cirúrgico, conforme pode ser observado na tabela A1 – Anexo A, não foi uniforme e padronizada, pois se tratava do estudo de uma série retrospectiva. Constatou-se, assim, a ocorrência de possível viés de classificação, em decorrência da falta de padronização no momento da cirurgia.

2. A análise histológica dos linfonodos foi realizada pelo método tradicional, que apresenta várias limitações.

Em primeiro lugar, o corte dos linfonodos para a confecção de lâminas histológicas é realizado apenas no equador da estrutura. Caso nesse corte não haja células malignas, rotineiramente não se realizam cortes adicionais. Apesar da maioria das células metastáticas colonizarem a região equatorial de linfonodos, pode haver colonização de porções polares.

Em segundo, existe grande limitação com a coloração dos espécimes histológicos apenas pelo método tradicional que faz uso da hematoxilina-eosina. Micrometástases de grupo de células e células isoladas podem ser detectadas por outros métodos. Entre eles, o método de imunohistoquímica, o método de RT-PCR (“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”), que identifica segmentos específicos do DNA a partir da pesquisa de RNA mensageiro, ou finalmente através de “microarray” que identifica simultaneamente milhares de transcritos de genes. Um grupo italiano, por exemplo, estudou micrometástases em linfonodos ressecados de cirurgias de tumores carcinóides pelo método de imunohistoquímica. Concluiu-se que este método foi mais sensível para a detecção de envolvimento de linfonodos em comparação ao método tradicional da hematoxilina-eosina¹¹⁸.

Nosso grupo de pesquisa também mostrou no 28º Congresso Mundial da Sociedade de Cirurgia Torácica que em nossa casuística

existem linfonodos classificados como N0 à análise tradicional pela hematoxilina-eosina e que apresentaram grupos de células ou células isoladas malignas pelo método da imunohistoquímica.

3. Este estudo foi inicialmente desenhado como um estudo tipo coorte retrospectivo com total aproximado de 180 casos de pacientes com e sem metástase linfática seguidos ambulatorialmente com diagnóstico de carcinóide broncopulmonar típico. Esta população seria proveniente de duas casuísticas de doentes; uma do HC da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e a outra do Hospital Europeu Georges Pompidou, em Paris, França. Juntas, tornar-se-iam uma das maiores séries já estudadas na literatura indexada. Entretanto, em virtude das dificuldades de obter recursos financeiros de órgãos fomentadores de pesquisa não foi possível realizar o desenho desejado inicialmente.

Foi, então, realizado um estudo retrospectivo, com uma amostra de casos consecutivos oriundos da França, com intuito de adequar os recursos. O departamento de Cirurgia Torácica e Cardiovascular do INCOR – FMUSP financiou todo o projeto sem apoio de outros órgãos.

Sabe-se, portanto, que haveria possibilidade de tornar este estudo mais robusto caso a casuística do HC da FMUSP também tivesse sido estudada.

4. As técnicas de imunohistoquímica baseiam-se na afinidade de anticorpos por determinadas regiões de uma macromolécula protéica

chamada epítopo. Estas regiões podem estar presentes sem qualquer alteração estrutural em proteínas selvagens ou mesmo em proteínas mutadas sem função preservadas. Desta forma, a mera afinidade de um anticorpo por um epítopo de uma proteína ou qualquer outra macromolécula não assegura que toda a estrutura desta macromolécula esteja íntegra e funcionante. 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.

No presente estudo foi utilizado anticorpo primário contra epítopo conhecido. Teoricamente, proteínas que apresentem mutações também podem ser marcadas, no entanto.

Para resolver tal problema, técnicas de análise da sequência dos ácidos nucleicos do DNA ou do RNA mensageiro têm sido cada vez mais utilizadas, proporcionando maior sensibilidade e especificidade. A maior desvantagem do estudo dos ácidos nucleicos 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.

O principal fator que torna o estudo de ácidos nucleicos menos aplicável na prática clínica, quando comparado ao de proteínas, é o custo.

5. Ausência de controle interno positivo nas lâminas testadas por imunohistoquímica.

Quando não há imunomarcção em uma lâmina, dois fenômenos podem ter ocorrido. Ou a molécula pesquisada não está presente (no caso o SSTR-2) ou ocorreu falha no preparo do método de imunohistoquímica. Neste último cenário reações de imunohistoquímica consideradas negativas não terão seus alvos identificados. Por isso, utilizam-se controles positivos de marcação, tanto internos quanto externos. O controle externo é realizado com o processamento de um tecido sabidamente positivo para a molécula estudada. Isto foi realizado. Porém, o ideal é ter um controle interno positivo, ou seja, uma célula que apresente sempre a imunomarcção pesquisada. No caso do receptor de somatostatina do subtipo 2 não há classicamente uma célula considerada como controle interno positivo da reação. Com a eventual presença deste controle haveria segurança em qualificar o ensaio de uma amostra como negativo.

5.2. DISCUSSÃO ACERCA DO 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 apresentam 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 aumento²⁴. Quando estes aglomerados celulares não ultrapassam o diâmetro de 5 mm, são definidos como “Tumorlets”.

Todos tumores carcinóides, mesmo os com potencial metastático, já tiveram dimensões que os definiam como “Tumorlets”²³, caso tivessem sido ressecados antes de ultrapassarem tal limite. Não existem estudos que provem a incapacidade de formações hiperplásicas neuroendócrinas benignas de atingirem diâmetros maiores que o acima estabelecido. Assim, estas formações celulares benignas seriam classificadas arbitrariamente como carcinóides de forma equivocada.

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 no DNA. Neoplasia é uma doença caracterizada por tais alterações, enquanto que hiperplasias apenas denotam funcionamento acelerado dos processos de divisão celular.

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

Destaca-se o caso de um paciente, não incluído neste estudo, que recusou tratamento cirúrgico após diagnóstico de carcinóide típico após biópsia endobrônquica. Após 7 anos do diagnóstico inicial este paciente procurou o ambulatório do HC da FMUSP para ser operado. Recebeu

tratamento cirúrgico e a análise histopatológica não evidenciou acometimento de linfonodos, mesmo após 7 anos do diagnóstico inicial. O paciente, ademais, permanece até hoje em seguimento e sem evidência de doença.

Também merece destaque o caso de uma paciente que não foi incluída neste estudo, mas que é parte da casuística do estudo de Das Neves Pereira³⁰. Esta apresentou metástase para 2 dos 14 linfonodos do mediastino dissecados durante sua cirurgia, e 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 linfonodomegalia notada à tomografia computadorizada de tórax do estadiamento inicial.

Nota-se, com estes casos anedóticos descritos acima que existem “problemas” no sistema de classificação atual que determina que tumores com 5mm devem ser considerados como “tumorlets”.

Desta forma, enquanto não for definido um critério objetivo que diferencie neoplasia de hiperplasia neuroendócrina broncopulmonar, não há como afirmar que indivíduos possuem 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 decorrente de alterações estruturais da seqüência de ácidos nucleicos que compõem a molécula de DNA.

5.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.3.1. Discussão da estatística descritiva

A constatação de que a média de idade foi de 47,04 anos com desvio padrão de 15,8 anos e com intervalo de confiança de 95% do erro da média igual a 2 anos apóia as evidências estabelecidas na literatura que demonstram que os tumores carcinóides broncopulmonares acometem preferencialmente indivíduos entre a quarta e quinta décadas de vida⁴⁹.

Nota-se, também, que em números absolutos, os carcinóides típicos acometem preferencialmente mulheres, principalmente nas maiores séries da literatura^{18,30,49,50,118}, apesar de alguns autores reportarem incidência semelhante entre os gêneros⁵⁰. Neste estudo retrospectivo também ficou evidente que a distribuição favoreceu o gênero feminino (62,9%). Não está claro se existem fatores que aumentem a distribuição no gênero feminino e quais seriam estes⁵⁵. A possibilidade de interferência do metabolismo hormonal da mulher na patogênese, a exemplo do que ocorre com determinados tipos de câncer de mama, será objeto de investigação futura de nossa linha de pesquisa.

Neste estudo não houve diferença estatística significativa entre as médias de idade de acordo com o gênero dos pacientes, porém já existem dados referentes ao ambulatório de tumores carcinóides do HC da FMUSP que confirmaram a percepção clínica de que a média de idade das mulheres tem o diagnóstico de tumor carcinóide é menor do que a média de idade em indivíduos do gênero masculino. Tais dados, com significância estatística já

aferida ainda não foram publicados. Porém, já fora, inclusos em trabalho aceito para publicação no *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, cuja a prova de impressão estará disponível no dia dois de julho deste ano. Já estão citados nesta conclusão para ilustrar a realidade do ambulatório de carcinóides do nosso hospital.

Aproximadamente 20% dos pacientes deste estudo apresentaram metástase linfática, dado que se assemelha aos publicados na literatura¹⁵⁻¹⁷, confirmando que esta doença - antigamente considerada indolente e benigna – pode desencadear o fenômeno da metástase.

Não existiu diferença estatística significativa entre os gêneros segundo a ocorrência de metástase linfática, de acordo com teste exato de Fischer ($p=0,140$ unicaudado).

Não há relatos na literatura que evidenciem maior ocorrência de metástase linfática no gênero feminino em séries que estudaram somente carcinóides típicos.

Da mesma forma, o estudo não conseguiu aferir relação entre as médias de idade e a ocorrência de metástase linfática. A literatura é robusta ao afirmar que em pacientes idosos os carcinóides são mais agressivos^{8,52}. Novamente, aponta-se que as casuísticas analisadas na literatura incluem carcinóides típicos e atípicos.

Ao serem analisados os pacientes em dois grupos etários arbitrários: abaixo e acima da média de idade geral da casuística, o teste *t* de Student não constatou diferença significativa entre os valores ($p=0,41$). Assim, não se pode afirmar, com base na amostra de população deste estudo, que os

carcinóides típicos têm maior malignidade em pacientes idosos. Ademais, visto que as populações estudadas na literatura envolvem não somente carcinóides típicos, mas também os atípicos, deve-se ter cautela para afirmar que existe relação entre idade e maior malignidade.

A localização central do tumor foi mais freqüente que a periférica na população deste estudo.

Sabe-se que à exceção de um trabalho⁸, a literatura remete ao conceito de que a localização periférica dos tumores carcinóides, em contrapartida à endobrônquica, tem correlação com maior malignidade⁵². No entanto, a maioria dos trabalhos revistos observa esta diferença quando analisados os carcinóides típicos e atípicos em conjunto, existindo poucos dados que avaliam somente uma população de doentes com carcinóides típicos. Um estudo dirigido por Das Neves Pereira em nossa linha de pesquisa no HC da FMUSP³⁰ reporta que não existe diferença estatística significativa entre a maior malignidade dos tumores carcinóides típicos de acordo com a localização da lesão.

Neste estudo, entretanto, que também analisou uma população de doentes com diagnóstico de carcinóide broncopulmonar típico, notou-se que existiu diferença estatística significativa entre o potencial de malignidade dos tumores em função da localização da lesão primária. Se tal evento ocorre em decorrência da origem européia da casuística – diferentemente da população estudada por Das Neves Pereira – ou se a posição periférica do tumor também é fator de pior prognóstico em tumores carcinóides típicos ainda deve ser objeto de estudo em maiores populações. Entretanto, esta é

a primeira evidência conhecida (quando somente carcinóides broncopulmonares típicos foram analisados) de que existe relação entre a localização periférica do tumor e maior malignidade.

O estudo também concluiu que 56 (90,3%) pacientes não apresentaram metástase hematogênica, ao passo que 6 (9,7%) tiveram diagnóstico do evento. Salienda-se que os pacientes com metástase hematogênica do presente estudo representaram 9,7% da população. Algumas séries da literatura, entretanto, reportam que a frequência de metástase hematogênica varia de 0,5 a 2%^{18,54}.

O presente estudo, conforme citado no capítulo Casuística e Métodos, foi realizado a partir da análise de 62 pacientes consecutivos operados para tratamento de tumores carcinóides típicos broncopulmonares. Esta análise de reduzido número de pacientes, alocados no estudo de forma consecutiva, pode ter contribuído para o resultado encontrado que não se assemelha ao da literatura.

Foi detectada a ocorrência de emagrecimento em três indivíduos neste estudo. Posteriormente, estes desenvolveram metástase hematogênica. De acordo com o teste exato de Fisher existe relação com significado estatístico entre emagrecimento e metástase hematogênica ($p=0,001$). Harpole⁸, em 1992, também apresentou dados que relacionam emagrecimento e pior prognóstico.

Por outro lado, não houve relação entre a ocorrência de metástase linfática e emagrecimento neste estudo.

5.3.2. Expressão dos receptores de Somatostatina (SSTR-2)

Merece destaque a expressão dos receptores de Somatostatina (SSTR-2) neste capítulo. Na população estudada 36 pacientes (58,1%) tinham tumores que expressavam SSTR-2, enquanto 26 não tinham tal expressão (41,9%).

A comprovação da imunoexpressão deste receptor proporciona inúmeras aplicabilidades clínicas aos pacientes com diagnóstico de carcinóide broncopulmonar típico. A partir deste achado, nunca descrito na literatura anteriormente, existem novas opções de diagnóstico, estadiamento, seguimento (OctreoScan®) e tratamento (terapia alvo com radionuclídeos). Estas aplicações clínicas, bem como suas importâncias a partir da determinação da imunoexpressão de SSTR-2, serão abordadas adiante em separado.

No entanto, a hipótese inicial que supunha a existência de relação entre maior malignidade e a ausência de imunoexpressão do SSTR-2, uma vez que a interação da Somatostatina com seu receptor desencadeia atividade celular antimitótica, não foi confirmada. A comparação da frequência de metástase linfática com a de SSTR-2 não demonstrou diferença estatística significativa (teste exato de Fischer $p=0,529$). Assim, com a referência deste estudo, não se pode afirmar que a ausência de imunoexpressão do SSTR-2 determina maior malignidade e pior prognóstico aos pacientes.

5.4. IMPORTÂNCIA CLÍNICA E APLICABILIDADE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA TIPO 2 EM TUMORES CARCINÓIDES BRONCOPULMONARES TÍPICOS

O estudo da presença ou ausência de receptores de somatostatina na superfície das células dos tumores carcinóides, assim como a quantificação da porcentagem de células positivas e também da concentração de receptores tem três aplicações práticas no campo assistencial. A primeira é o uso diagnóstico, a segunda é o uso para estadiamento e a terceira é a aplicação nas terapias alvo.

5.4.1. Uso em diagnóstico e em estadiamento

A detecção do receptor apenas nas células do tumor primário já seria um dado de grande aplicação prática, por si só, pois poderia ser utilizado em casos nos quais fosse necessário realizar um diagnóstico diferencial em que houvesse a hipótese de tumor carcinóide típico, contra outra hipótese diagnóstica de doença de tratamento não cirúrgico.

Por exemplo, em um paciente com tumor periférico compatível com a hipótese de tumor carcinóide, cujo tratamento é a ressecção cirúrgica, mas também com hipótese diagnóstica de lesão fúngica (*criptococus*) e cuja biópsia percutânea transtorácica não fosse factível.

Imagine, agora, um paciente obeso, não tabagista, com menos de 50 anos, sem sintomas, sinais ou história de neoplasia prévia, com um nódulo pulmonar periférico de contornos bem definidos, não calcificado, inferior a

três centímetros, num lobo inferior, distante da parede torácica e que não existia há um ano. Tumor carcinóide seria uma das hipóteses.

A biópsia transtorácica, realizada em um paciente obeso, para alcançar uma lesão pequena e distante da parede torácica poderia ser uma opção, mas talvez esta não seria realizada em condições ideais. O risco de pneumotórax ou lesão de feixe vasculo-nervoso intercostal ou o risco de não se obter uma amostra de tecido suficiente para o diagnóstico seria considerável.

Nestes casos o OctreoScan®, exame de imagem específico e sensível para a detecção de tumores carcinóides típicos, poderia ser uma opção à punção transtorácica ou mesmo aos outros métodos diagnósticos, como a biópsia transbrônquica guiada por radioscopia.

Deve-se, ainda, salientar que o OctreoScan® orienta o diagnóstico de tumor carcinóide ao mesmo tempo em que realiza o estadiamento.

O OctreoScan®, além disso, possibilita estadiamento mais acurado, uma vez que também investiga o Sistema Nervoso Central, já que ocorre interação do radionuclídeo com o receptor celular, fato não observado em outros exames, como o PET-CT.

Para o argumento do elevado custo do exame existem justificativas que podem ser consideradas. A primeira é a de que não há estudos que comprovem que a realização de todas as inúmeras etapas e exames inerentes a cada uma delas, necessárias para o diagnóstico, proporcione menor custo do que o OctreoScan®. A segunda justificativa é a de que todo método diagnóstico de propedêutica armada que persista na prática médica

apresenta, historicamente, uma curva descendente de custo. Finalmente, a descoberta da utilização adequada do método é a forma mais racional de se propor soluções frente a situações particulares como as acima descritas.

Este exame está disponível no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um serviço que, além da assistência, tem como objetivos a pesquisa e o ensino. Espera-se, assim, que o exame seja indicado da forma mais racional possível, e somente com a utilização racional em uma série de pacientes selecionados é que se determinará se tal método é um recurso cujo custo lhe seja proibitivo ou desaconselhado.

Uma das formas de se descobrir qual o sub grupo de pacientes que se beneficiaria do exame, seria determinar quais são os pacientes que possuem tumores com o receptor que é indispensável à formação da imagem diagnóstica. Este ramo da linha de pesquisa que se inicia agora, com a conclusão desta tese, possui, portanto, imediata aplicação clínica e cirúrgica.

Para o planejamento terapêutico é mandatório o conhecimento da extensão do acometimento anatômico da doença, ou seja, do estadiamento da doença. Neste sentido, o OctreoScan® deve ser considerado opção ao armamentário de propedêutica armada em pacientes com tumores que expressam SSTR-2. Salienta-se que o estudo de imunohistoquímica para a detecção do SSTR-2 pode ser realizado em pequenas amostras de tecido, rapidamente e possui baixo custo. Estima-se que uma alíquota de anticorpos para determinar a imunoexpressão de SSTR-2 custe 3500 reais. Sob

condições ideais esta alíquota realiza cerca de 100 diferentes ensaios e tem durabilidade de aproximadamente 5 anos.

5.4.2. Estadiamento intra-operatório

Não parece que exista benefício em realizar estadiamento intra-operatório do mediastino baseado em detecção de radioatividade oriunda de radionuclídeos direcionados contra o SSTR-2.

Em primeiro lugar, o estadiamento pré-operatório é imperativo para a determinação da conduta cirúrgica.

Em segundo, os pacientes categorizados como alto risco possuem freqüentemente indicação de esvaziamento linfático. Logo, não há vantagem aparente no uso do estadiamento intra-operatório baseado na detecção de radioatividade.

5.4.3. Tratamento com terapia alvo

Desde o final dos anos 90 do século passado a oncologia moderna vem incorporando ao seu cotidiano as chamadas terapias alvo. Por definição são modalidades terapêuticas que atuam somente nas células neoplásicas, poupando tecidos sadios e conferindo ao paciente menores toxicidades.

Assim, acoplar um radionuclídeo, ou um átomo de metal, ou um polímero de droga citotóxica a uma molécula de análogo sintético de somatostatina ofereceria potencial terapêutico contra os tumores carcinóides, especialmente se SSTR-2 fossem expressos, transformando o binômio formado em terapia alvo.

O binômio mais estudado é o que associa um análogo sintético a uma molécula de radionuclídeo. Este binômio é administrado por via endovenosa e uma dose radioativa efetiva é direcionada ao tumor de modo seletivo, uma vez que somente o clone neoplásico tem capacidade de internalizar a molécula, através do SSTR-2.

Esta modalidade de tratamento já está em uso em tumores neuroendócrinos oriundos ou com metástase em fígado, pâncreas e trato gastro-intestinal. Os Países Baixos e a Escandinávia possuem os centros pioneiros no uso desta abordagem.

Os binômios mais estudados e utilizados na prática clínica são o 90-Yttrium-Octreotide (DOTATOC), 90-Yttrium-Lanreotide (DOTALAN) e o 177-Lutecio-Octreotate (DOTATATE). Esta modalidade terapêutica proporciona taxas de resposta ao redor de 80% em alguns estudos¹¹⁴.

Infere-se que nos tumores carcinóides broncopulmonares típicos esta modalidade terapêutica também pode ser aplicada. O racional para tal aplicação tem apoio na detecção da imunoexpressão de SSTR-2 que este estudo demonstrou. Obviamente, em um cenário ideal, estudos clínicos controlados são necessários. Entretanto, a detecção da expressão de SSTR-2 nos tumores estudados neste trabalho permite a indicação desta modalidade terapêutica em pacientes que não possuem outras perspectivas de tratamento.

Por fim, como destacado ao longo deste capítulo, a expressão de SSTR-2 nos tumores carcinóides broncopulmonares possibilita, de imediato, aplicabilidade diagnóstica e terapêutica para alguns pacientes.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Os tumores carcinóides típicos broncopulmonares expressaram receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2).
2. Não existiu relação entre a expressão de SSTR-2 e a ocorrência de metástase linfática.
3. O SSTR-2 não foi uma variável independente preditiva do risco individual de metástase linfática.
4. O índice de expressão imunohistoquímico não foi uma variável independente preditiva do risco individual de metástase linfática.

ANEXOS

Anexo A

Tabela A1: Dados clínicos e histopatológicos

AP	# caso	Genero	idade	sintomas	tosse	hemopt	dispnéia	dor	febre
numero	numero	1-masc / 2-fem	anos	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao
C99.04209	1	1	65	1	0	0	0	0	0
C99.01776	2	1	54	0	0	0	0	0	0
C00.3082	3	1	30	1	0	0	0	0	0
C00.1670	4	1	68	1	0	0	0	0	0
C00.39	5	2	47	0	1	0	0	0	0
00.H.872	6	1	27	0	1	0	0	0	0
01.H.7418	7	2	52	0	0	0	1	1	0
C93.03782	8	2	36	1	0	0	0	0	0
C94.02437	9	2	74	0	1	0	0	0	0
C94.04590	10	1	55	1	0	0	0	0	0
C94.04814	11	2	36	0	0	0	0	1	0
C94.05786	12	2	45	0	1	0	0	0	0
C95.01960	13	1	43	0	0	1	0	0	0
C95.02228	14	1	63	0	0	0	0	0	0
C96.00283	15	2	50	1	0	0	0	0	0
C96.03629	16	1	27	1	0	0	0	0	0
C97.05886	17	2	1	1	0	0	0	0	0
C97.01069	18	1	44	0	0	0	0	0	0
C98.03305	19	2	42	0	0	0	0	1	0
A12686	20	2	43	1	0	0	0	0	0
A12331	21	2	49	0	0	1	0	0	0
A12884	22	2	45	0	1	0	0	0	0
A12793	23	1	44	1	0	0	0	0	0
A13502	24	2	52	1	0	0	0	0	0
A14670	25	2	72	1	0	0	0	0	0
C91.02459	26	1	53	1	0	0	0	0	0
C92.00793	27	1	57	1	0	0	0	0	0
93.5641	28	2	28	0	0	0	0	0	0
95.00302	29	2	69	1	0	0	0	0	0
93.4532	30	2	57	0	0	0	0	0	0
90.17235	31	2	77	1	0	0	0	0	0
A14171	32	1	27	0	0	1	0	0	0
91.4621	33	1	46	0	0	0	0	0	1
92.3681	34	1	72	0	1	0	0	0	1
96.4023	35	1	34	0	0	1	0	0	0
99.1451	36	1	30	0	0	0	0	0	0
01H3376	37	2	66	0	1	0	1	0	0
A3183	38	2	31	0	1	0	0	1	0

Continuação

AP	# caso	Genero	idade	sintomas	tosse	hemopt	dispnéia	dor
numero	numero	1-masc / 2-fem	anos	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao
91.01533	39	2	70	0	1	0	0	0
02.H1310	40	1	34	0	0	1	0	0
00H22810	41	1	50	0	0	0	0	0
97.792	42	2	52	1	0	0	0	0
01H8019	43	2	61	0	0	0	0	0
96.3131	44	1	71	0	0	0	0	0
95.1993	45	2	58	1	0	0	0	0
994210	46	1	29	0	0	0	0	0
944913	47	2	57	1	0	0	0	0
A2337	48	2	54	0	0	0	0	0
911669	49	2	45	0	1	1	0	0
972448	50	2	41	0	1	1	0	0
945369	51	2	29	0	0	0	1	0
95.4624	52	2	19	0	0	0	0	0
97.5866	53	2	27	1	0	0	0	0
A14304	54	2	43	1	0	0	0	0
99313	55	2	22	0	0	0	0	0
91.51806	56	2	53	0	1	1	0	0
91399	57	2	42	0	1	0	0	0
01H5513	58	2	42	1	0	0	0	0
98.1806	59	1	40	0	0	0	0	1
97.177	60	2	36	0	0	0	0	0
93.6252	61	2	64	0	1	0	0	0
91.3893	62	2	67	1	0	0	0	0

Continuação

AP	# caso	febre	infecção	perda peso em Kg	tabaco	localização	milímetros
numero	numero	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	1-sim / 0-nao	central - 0 / perif -1	mm
C99.04209	1	0	0	0	0	1	8
C99.01776	2	0	1	0	11	0	20
C00.3082	3	0	0	0	0	0	20
C00.1670	4	0	0	0	0	1	25
C00.39	5	0	1	0	0	0	60
00.H.872	6	0	1	0	0	0	25
01.H.7418	7	0	0	0	0	0	60
C93.03782	8	0	0	0	30	0	6
C94.02437	9	0	0	0	20	1	20
C94.04590	10	0	0	0	53	0	30
C94.04814	11	0	0	0	0	1	25
C94.05786	12	0	0	0	0	0	10
C95.01960	13	0	0	0	35	1	15
C95.02228	14	0	1	0	70	1	35
C96.00283	15	0	0	0	0	1	15
C96.03629	16	0	0	0	0	0	35
C97.05886	17	0	0	0	7	0	40
C97.01069	18	0	1	0	20	0	20
C98.03305	19	0	1	0	0	0	20
A12686	20	0	0	0	0	1	35
A12331	21	0	0	0	20	0	35
A12884	22	0	0	0	0	0	15
A12793	23	0	0	0	30	0	13
A13502	24	0	0	0	0	0	35
A14670	25	0	0	0	0	0	40
C91.02459	26	0	0	0	60	1	20
C92.00793	27	0	0	0	10	0	30
93.5641	28	0	1	0	0	0	25
95.00302	29	0	0	0	0	1	15
93.4532	30	0	1	0	0	0	25
90.17235	31	0	0	1 (6kg)	0	1	40
A14171	32	0	0	0	0	0	25
91.4621	33	1	0	0	50	0	15
92.3681	34	1	0	0	30	0	60
96.4023	35	0	0	0	0	0	15
99.1451	36	0	1	0	5	0	20
01H3376	37	0	0	0	0	1	7
A3183	38	0	0	0	12	0	35

Continuação

AP	# caso	febre	infecção	perda peso em Kg	tabaco	localização	milímetros
numero	numero	1-sim / 0- nao	1-sim / 0- nao	1-sim / 0- nao	1-sim / 0- nao	central - 0 / perif -1	mm
91.01533	39	0	0	1 (10kg)	0	0	60
02.H1310	40	0	0	0	0	0	25
00H22810	41	0	1	0	30	0	20
97.792	42	0	0	0	50	0	25
01H8019	43	0	1	1 (17kg)	0	0	60
96.3131	44	1	0	0	10	0	12
95.1993	45	0	0	0	0	1	11
994210	46	0	1	0	10	0	22
944913	47	0	0	0	0	1	20
A2337	48	0	1	0	0	0	20
911669	49	0	0	0	0	0	40
972448	50	0	0	0	0	0	25
945369	51	0	0	0	0	1	30
95.4624	52	0	1	0	0	0	18
97.5866	53	0	0	0	7	0	40
A14304	54	0	0	0	50	0	20
99313	55	1	1	0	0	0	55
91.51806	56	0	0	0	30	1	30
91399	57	1	0	0	0	1	10
01H5513	58	0	0	0	40	0	35
98.1806	59	1	0	0	8	0	25
97.177	60	0	1	0	0	0	10
93.6252	61	1	0	0	20	0	40
91.3893	62	0	0	0	0	1	30

Continuação

AP	# caso	pos linfon	LFN diss	t	n	m
numero	numero	número				
C99.04209	1	2	4	1	2	0
C99.01776	2	0	6	1	0	0
C00.3082	3	2	6	3	1	0
C00.1670	4	0	3	1	0	0
C00.39	5	2	12	2	1	0
00.H.872	6	0	5	1	0	0
01.H.7418	7	0	24	2	0	0
C93.03782	8	0	10	1	0	0
C94.02437	9	1	6	1	1	0
C94.04590	10	1	5	2	2	0
C94.04814	11	1	5	1	1	0
C94.05786	12	0	5	1	0	0
C95.01960	13	1	5	1	2	0
C95.02228	14	1	6	2	2	0
C96.00283	15	0	8	1	0	1
C96.03629	16	0	5	2	0	0
C97.05886	17	0	5	2	0	0
C97.01069	18	4	6	2	2	1
C98.03305	19	0	9	3	0	0
A12686	20	2	4	2	2	0
A12331	21	1	5	2	1	0
A12884	22	0	1	1	0	0
A12793	23	0	5	1	0	0
A13502	24	2	3	2	2	0
A14670	25	0	6	2	0	0
C91.02459	26	1	3	1	1	0
C92.00793	27	0	3	2	0	0
93.5641	28	0	8	1	0	0
95.00302	29	0	11	1	0	0
93.4532	30	0	10	1	0	0
90.17235	31	0	4	2	0	1
A14171	32	0	6	1	0	0
91.4621	33	0	4	2	0	0
92.3681	34	0	4	2	0	0
96.4023	35	0	8	2	0	0
99.1451	36	0	6	2	0	0
01H3376	37	0	5	1	0	0
A3183	38	0	6	2	0	0
91.01533	39	0	4	2	0	1

AP	# caso	pos linfon	LFN diss	t	n	m
numero	numero	número				
02.H1310	40	0	5	1	0	0
00H22810	41	0	11	2	0	0
97.792	42	0	6	1	0	0
01H8019	43	0	5	2	0	1
96.3131	44	0	5	1	0	0
95.1993	45	0	4	1	0	0
994210	46	0	4	1	0	0
944913	47	0	10	1	0	0
A2337	48	0	5	2	0	0
911669	49	0	4	2	0	0
972448	50	0	8	2	0	0
945369	51	0	13	2	0	0
95.4624	52	0	9	2	0	1
97.5866	53	0	5	2	0	0
A14304	54	0	4	2	0	0
99313	55	0	17	2	0	0
91.51806	56	0	5	2	0	0
91399	57	0	3	1	0	0
01H5513	58	0	19	2	0	0
98.1806	59	0	7	2	0	0
97.177	60	0	5	1	0	0
93.6252	61	0	5	2	0	0
91.3893	62	0	4	2	0	0

Anexo B

Tabela B1: Dados da quantificação do marcador estudado (SSTR-2)

AP	# caso	SSTR-2	intensidade	extensão	SCORE
numero	numero	0 - neg / 1 - pos			le valor
C99.04209	1	0	0	0	0
C99.01776	2	0	0	0	0
C00.3082	3	1	3	2	6
C00.1670	4	0	0	0	0
C00.39	5	1	1	1	1
00.H.872	6	1	1	2	2
01.H.7418	7	1	2	3	6
C93.03782	8	0	0	0	0
C94.02437	9	1	1	3	3
C94.04590	10	1	2	1	2
C94.04814	11	1	1	3	3
C94.05786	12	1	1	1	1
C95.01960	13	0	0	0	0
C95.02228	14	1	2	3	6
C96.00283	15	0	0	0	0
C96.03629	16	1	1	1	1
C97.05886	17	1	3	3	9
C97.01069	18	1	2	2	4
C98.03305	19	1	2	3	6
A12686	20	1	1	1	1
A12331	21	0	0	0	0
A12884	22	1	3	2	6
A12793	23	0	0	0	0
A13502	24	0	0	0	0
A14670	25	1	1	2	2
C91.02459	26	1	3	1	3
C92.00793	27	1	3	2	6
93.5641	28	1	2	2	4
95.00302	29	0	0	0	0
93.4532	30	1	2	1	2
90.17235	31	1	2	1	2
A14171	32	0	0	0	0
91.4621	33	0	0	0	0
92.3681	34	1	2	1	2
96.4023	35	1	2	1	2
99.1451	36	1	2	2	4
01H3376	37	1	2	3	6
A3183	38	0	0	0	0

AP	# caso	SSTR-2	intensidade	extensão	SCORE le
numero	numero	0 - neg / 1 - pos			valor
91.01533	39	0	0	0	0
02.H1310	40	1	2	2	4
97.792	42	0	0	0	0
01H8019	43	1	2	1	2
95.1993	45	1	2	2	4
994210	46	0	0	0	0
944913	47	0	0	0	0
A2337	48	1	2	2	4
911669	49	0	0	0	0
972448	50	1	2	1	2
945369	51	0	0	0	0
95.4624	52	1	2	1	2
97.5866	53	0	0	0	0
A14304	54	0	0	0	0
99313	55	0	0	0	0
91.51806	56	1	3	3	9
91399	57	0	0	0	0
01H5513	58	0	0	0	0
98.1806	59	1	3	3	9
97.177	60	1	3	3	9
93.6252	61	1	2	2	4
91.3893	62	0	0	0	0

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Aaronson AS. Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146-53
2. Kulke MH, Mayer RJ. Medical progress: Carcinoid tumors. *N Engl J Med*. 1999;340:858-68.
3. Granberg D, Sundin A, Janson ET, Oberg K, Skogseid B, Westlin JE. Octreoscan in patients with bronchial carcinoid tumours. *Clin Endocrinol*. 2003;59:793-9.
4. Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kam BL, Teunissen JJ, Kooij PP, de Herder WW, Feelders RA, van Eijck CH, de Jong M, Srinivasan A, Erion JL, Krenning EP. Treatment of patients with gastro-entero-pancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [177-Lu-DOTA(0),Tyr3]octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30:417-22
5. Creutzfeldt W. Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg*. 1996;20:126-31.
6. Feyrter F. On the distinguishing features between bronchial carcinoid and bronchial muciparous adenoma. *Frankf Z Pathol*. 1959;69:659-66.
7. Tani EM, Moraes HP, Bacchi CE. Tumores do pulmão: estudo citológico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico de 16 casos. *J Pneumol*. 1986;12:222-8.

8. Harpole DH Jr., Feldman JM, Buchanan S, Young WG, Wolfe WG. Bronchial carcinoid tumors: a retrospective analysis of 126 patients. *Ann Thorac Surg.* 1992;54:50-4; discussion 54-5.
9. 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;7:8-11.
10. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972;64:413-21.
11. 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;126:545-53.
12. Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L, Facciolo F, Martelli M. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:1781-5.
13. 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;208:181-5.
14. 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;14:127-32.

15. Hayakawa M, Maeda H, Sawabata N, Funakoshi Y, Okumura Y. A clinical study of resected bronchopulmonary carcinoids. *Kyobu Geka*. 2001;54:769-72.
16. Huwer H, Kalweit G, Krüger B, Straub U, Schäfers HJ. Bronchopulmonary carcinoids: surgical therapy and prognosis. *Pneumologie*. 1996;50:786-9.
17. Morandi U, Casali C, Rossi G. Bronchial typical carcinoid tumors. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;18:191-8.
18. Schreurs AJ, Westermann CJ, van der 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;104:1470-5.
19. Bensch KG, Gordon GB, Miller LR. Electron microscopic and biochemical studies on the bronchial carcinoid tumor. *Cancer*. 1965;18:592-602.
20. Hage E. Histochemistry and fine structure of bronchial carcinoid tumours. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*. 1973;361:121-8.
21. 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;55:1303-11.
22. Taylor W. Pulmonary argyrophil cells at high altitude. *J Pathol*. 1977;122:137-44.

23. Froelich F. Die "helle-zelle" der bronchialshlenhaut und ihre beziehungenzum problem der chemorezeptoren. *Frankf Z Pathol.* 1949;60:517-22.
24. Lauweryns JM, Peuskens JC. Neuro-epithelial bodies (neuroreceptor or secretory organs?) in human infant bronchial and bronchiolar epithelium. *Anat Rec.* 1972;172:471-81.
25. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest.* 1983;49:519-37.
26. Reznik-Schüller H. Proliferation of endocrine (APUD-type) cells during early N-diethylnitrosamine-induced lung carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* 1976;1:255-8.
27. Reznik-Schüller H. Ultrastructural alterations of APUD cells during nitrosamine-induced lung carcinogenesis. *J Pathol.* 1977;121:79-82.
28. Gosney JR. Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric and adult lung disease. *Microsc Res Tech.* 1997;37:107-13.
29. 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;32:350-3.
30. Pereira, JCN. *Estudo da correlação entre a incidência de metástases em tumores carcinoides típicos broncopulmonares e biomarcadores teciduais, variáveis clínicas e índice de risco.* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

31. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (eds.). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press: Lyon 2004.
32. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol Annu*. 1983;18 Pt 1:287-330.
33. 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;6:643-54.
34. 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.
35. 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;120:209-16.
36. Queiroz AC. Quimiodectomas microscópicos do pulmão. *Acta Med Port*. 1979;1:689-95.
37. Onuki N, Wistuba II, Travis WD, Virmani AK, Yashima K, Brambilla E, Hasleton P, Gazdar AF. Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Cancer*. 1999;85:600-7.

38. Tsioulis G, Muto T, Kubota Y, Masaki T, Suzuki K, Akasu T, Morioka Y. DNA ploidy pattern in rectal carcinoid tumors. *Dis Colon Rectum*. 1991;34:31-6.
39. Padberg BC, Woenckhaus J, Hilger G, Beccu L, Jochum W, Range U, Kastendieck H, Schröder S. DNA cytophotometry and prognosis in typical and atypical bronchopulmonary carcinoids. A clinicomorphologic study of 100 neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:815-22.
40. 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.
41. Lubarsch O. Über den primären krebs des ileum, nebst bemerkungen über das gleichzeitige vorkommen von krebs und tuberculose. *Virchows Arch*. 1888;111:280-370.
42. Oberndorfer S. Karzinoid Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol*. 1907;1:425-8.
43. 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;89:819-25.
44. World Health Organization. Histological typing of lung tumors. *Am J Clin Pathol*. 1982;77:123-36.

45. Travis WD, Gal AA, Colby TV, Klimstra DS, Falk R, Koss MN. Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. *Hum Pathol*. 1998;29:272-9.
46. 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;37:127-35.
47. Berge T, Linell F. Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. 1976;84:322-30.
48. Modlin IM, Sandor A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer*. 1997;79:813-29.
49. Fink G, Krelbaum T, Yellin A, Bendayan D, Saute M, Glazer M, Kramer MR. Pulmonary carcinoid presentation, diagnosis, and outcome in 142 cases in Israel and review of 640 cases from the literature. *Chest*. 2001;119:1647-51.
50. el-Naggar AK, Ballance W, Karim FW, Ordóñez NG, McLemore D, Giacco GG, Batsakis JG. Typical and atypical bronchopulmonary carcinoids. A clinicopathologic and flow cytometric study. *Am J Clin Pathol*. 1991;95:828-34.
51. Caplin ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK. Carcinoid tumour. *Lancet*. 1998;352:799-805.
52. Torre M, Barberis M, Barbieri B, Bonacina E, Belloni P. Typical and atypical bronchial carcinoids. *Respir Med*. 1989;83:305-8.

53. Okike N, Bernatz PE, Woolner LB. Carcinoid tumors of the lung. *Ann Thorac Surg*, 1976;22:270-7.
54. Hage R, la Rivière AB, Seldenrijk CA, van den Bosch JMM. Update in Pulmonary Carcinoid Tumors: A Review Article. *Ann Surg Oncol*. 2003;10:697-704.
55. Iglesias M, Belda J, Baldó X, Gimferrer JM, Catalán M, Rubio M, Serra M. Bronchial carcinoid tumor: a retrospective analysis of 62 surgically treated cases. *Arch Bronconeumol*. 2004;40:218-21.
56. Nessi R, Basso Ricci P, Basso Ricci S, Bosco M, Blanc M, Uslenghi C. Bronchial carcinoid tumors: radiologic observations in 49 cases. *J Thorac Imaging*. 1991; 6:47-53.
57. McCaughan BC, Martini N, Bains MS: Bronchial carcinoids. Review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985; 89:8-17.
58. Soga J, Yakuwa Y, Osaka M. Carcinoid syndrome: a statistical evaluation of 748 reported cases. *J Exp Clin Cancer Res*. 1999;18:133-41.
59. Carroll DG, Delahunt JW, Teague CA, Cooke RR, Adams EF, Christofides ND, Bloom SR, Terenghi G, Polak JM. Resolution of acromegaly after removal of a bronchial carcinoid shown to secrete growth hormone releasing factor. *Aust N Z J Med*. 1987;17:63-7.
60. Kvols L. Medical oncology considerations in patients with metastatic neuroendocrine carcinomas. *Semin Oncol*. 1994;21(5 suppl13):56-60.
61. Klöppel G, Heitz PU. Classification of normal and neoplastic neuroendocrine cells. *An NY Acad Sci*. 1994;733:19-23.

62. Moertel CG. Karnofsky memorial lecture. An odyssey in the land of small tumors. *J Clin Oncol*. 1987;5:1502-22.
63. 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.
64. Cooper DK, Belcher JR. Conservative surgery for bronchial adenomata. *Thorax*. 1976;31:44-8.
65. 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;4:527-32; discussion 533.
66. 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;59:78-83.
67. Ximenes Netto M, Martinelli JG. Adenoma Brônquico. *Rev Bras Cir*. 1972;62:13-6.
68. Schrevens L, Vansteenkiste J, Deneffe G, De Leyn P, Verbeken E, Vandenberghe T, Demedts M. Clinical-radiological presentation and outcome of surgically treated pulmonary carcinoid tumours: a long-term single institution experience. *Lung Cancer*. 2004;43:39-45.
69. 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;21:913-7.
70. Pereira JCN, Silva AGP, Soares F, Ab'Saber AM, Schmidt A, Rodrigues OR, Garippo A, Capelozzi M, Campos JR, Takagaki T, Jatene FB,

- Martins S, 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.
71. Rea F, Binda R, Spreafico G, Calabrò F, Bonavina L, Cipriani A, Di Vittorio G, Fassina A, Sartori F. Bronchial carcinoids: a review of 60 patients. *Ann Thorac Surg*. 1989;47:412-4.
72. 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;54:158-66.
73. 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;24:363-9.
74. Grote TH, Macon WR, Davis B, Greco FA, Johnson DH. Atypical carcinoid of the lung. A distinct clinicopathologic entity. *Chest*. 1988;93:370-5.
75. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
76. Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton PS, Travis WD, Brambilla E. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol*. 2003;34:136-42.
77. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V, Lucchi M, Mussi A, Angeletti CA, Bevilacqua G. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*. 1998;34:718-23.

78. Lloyd RV. Utility of Ki-67 as a prognostic marker in pancreatic endocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 1998;109:245-7.
79. Bukowski RM, Johnson KG, Peterson RF, Stephens RL, Rivkin SE, Neilan B, Costanzi JH. A phase II trial of combination chemotherapy in patients with metastatic carcinoid tumors: a Southwest Oncology Group study. *Cancer*. 1987;60:2891-5.
80. Engstrom PF, Lavin PT, Moertel CG, Folsch E, Douglass HO Jr. Streptozocin plus fluorouracil versus doxorubicin therapy for metastatic carcinoid tumor. *J Clin Oncol*. 1984;2:1255-9.
81. Bajetta E, Ferrari L, Procopio G, Catena L, Ferrario E, Martinetti A, Di Bartolomeo M, Buzzoni R, Celio L, Vitali M, Beretta E, Seregni E, Bombardieri E. Efficacy of a chemotherapy combination for the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. *Ann Oncol*. 2002;13:614-21.
82. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. 1991;68: 227-32.
83. Mackley HB, Videtic GM. Primary carcinoid tumors of the lung: a role for radiotherapy. *Oncology (Williston Park)*. 2006;20:1537-43; discussion 1544-5, 1549.
84. Schupak KD, Wallner KE. The role of radiation therapy in the treatment of locally unresectable or metastatic carcinoid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991;20:489-95.

85. Krulich L; Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*. 1968;83:783-90.
86. Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med*. 1983;309:1495-501.
87. de Herder WW, Hofland LJ, van der Lely AJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10:451-8.
88. Virgolini I, Angelberger P, Li S, Yang Q, Kurtaran A, Raderer M, Neuhold N, Kaserer K, Leimer M, Peck-Radosavljevic M, Scheithauer W, Niederle B, Eichler HG, Valent P. In vitro and in vivo studies of three radiolabelled somatostatin analogues: 123I-octreotide (OCT), 123I-Tyr-3-OCT and 111In-DTPA-D-Phe-1-OCT. *Eur J Nucl Med*. 1996;23:1388-99.
89. Cukiert A, Liberman B. *Neuroendocrinologia clinica e cirúrgica*. São Paulo: Lemos Editorial; 2002.
90. Reubi JC, Kvols L, Krenning E, Lamberts SW. Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. *Metabolism*. 1990;39(9 Suppl 2):78-81.
91. Reubi JC, Waser B, Horisberger U, Krenning E, Lamberts SW, Gebbers JO, Gersbach P, Laissue JA. In vitro autoradiographic and in vivo scintigraphic localization of somatostatin receptors in human lymphatic tissue. *Blood*. 1993;82:2143-51.
92. Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC. Molecular cloning, functional

- characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin—28. *Mol Pharmacol*. 1994;45: 417-27.
93. Corness JD, Demchyshyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB. A human somatostatin receptor (SSTR-3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like-peptides. *FEBS Lett*. 1993;321:279-84.
94. Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996;334:246-54.
95. Rahier J, Guiot Y, Sempoux C. Endocrine tumours, somatostatin and somatostatin receptors. *Acta Gastroenterol Belg*. 2004;67:282-4.
96. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:86-8.
97. Bruns C, Raulf F, Hoyer D, Schloos J, Lübbert H, Weckbecker G. Binding properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism*. 1996;45(8 Suppl 1):17-20.
98. Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Somatostatin receptor scintigraphy in patients with carcinoid tumors. *World J Surg*. 1996;20:157-61.
99. Yarbrow JW, Bornstein RS, Mastrangelo MJ, eds. Somatostatin receptor imaging: tumor localization, detection, and therapeutic implications. *Semin Oncol* 1994;21(suppl 13):1-71.

100. Kwekkeboom D, Krenning EP, de Jong M. Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med*. 2000;41:1704-13.
101. Hofslí E. The somatostatin receptor family – a window against new diagnosis and therapy of cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2002;122:487-91.
102. Lamberts SW, Bakker WH, Reubi JC, Krenning EP: Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumors. *N Engl J Med*. 1990;323:1246-9.
103. O'Byrne KJ, Schally AV, Thomas A, Carney DN, Steward WP. Somatostatin, its receptors and analogs, in lung cancer. *Chemotherapy*. 2001;47(Suppl 2):78-108.
104. Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, La Rosa S, Rapa I, Ferrero A, Mansueto G, Righi L, Garancini S, Capella C, De Rosa G, Dogliotti L, Colao A, Papotti M. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol*. 2007;20:1172-82.
105. Balon HR, Goldsmith SJ, Siegel BA, Silberstein EB, Krenning EP, Lang O, Donohoe KJ; Society of Nuclear Medicine. Procedure guideline for somatostatin receptor scintigraphy with (111)In-pentetreotide. *J Nucl Med*. 2001;42:1134-8.
106. Janson ET, Stridsberg M, Gobl A, Wetlin JE, Oberg K. Determination of somatostatin receptor subtype 2 in carcinoid tumors by immunohistochemical investigation with somatostatin receptor subtype 2 antibodies. *Cancer Res*. 1998;58:2375–8.

107. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*. 2001;28:836–46.
108. Krenning EP, Bakker WH, Breeman WA, Koper JW, Kooij PP, Ausema L, Lameris JS, Reubi JC, Lamberts SW. Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet*. 1989;1:242-4.
109. Kvols LK, Brown ML, O'Connor MK, Hung JC, Hayostek RJ, Reubi JC, Lamberts SW: Evaluation of a radiolabeled somatostatin analog (I-123 octreotide) in the detection and localization of carcinoid and islet cell tumors. *Radiology*. 1993;187:129-33.
110. Buscombe JR. Radiopeptides from diagnosis to therapy. *Braz Arch Biol Technol*. 2002;45-49.
111. Virgolini I, Traub T, Novotny C, Leimer M, Föger B, Li SR, Patri P, Pangerl T, Angelberger P, Raderer M, Burggasser G, Andreae F, Kurtaran A, Dudczak R. Experience with Indium-111 and Yttrium-90-labeled somatostatin analogs. *Curr Pharm Des*. 2002;8:1781-807.
112. Traub T, Petkov V, Ofluoglu S, Pangerl T, Raderer M, Fueger BJ, Schima W, Kurtaran A, Dudczak R, Virgolini I. 111In-DOTA-lanreotide scintigraphy in patients with tumors of the lung. *J Nucl Med*. 2001;42:1309-15.
113. Oberg K. Diagnosis and treatment of carcinoid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2003;3:863-77.

114. De Jong M, Valkema R, Jamar F, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Breeman WA, Bakker WH, Smith C, Pauwels S, Krenning EP. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med.* 2002;32:133-40.
115. Kirshbom PM, Harpole DH. Bronchial gland tumors. In: Pearson FG, Cooper JD, Deslauriers J, Ginsberg RJ, Hiebert CA, Patterson GA, et al. *Thoracic surgery.* 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002. p. 763-71.
116. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 6^a ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 1985.
117. El-Gohary YM, Metwally G, Saad RS, Robinson MJ, Mesko T, Poppiti RJ. Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2008;129:578-86.
118. Godwin JD 2nd, Brown CC. Comparative epidemiology of carcinoid and oat-cell tumors of the lung. *Cancer.* 1977;40:1671-3.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Bibliografia consultada – para elaboração do método estatístico:

- Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc; 1989.
- Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: John Wiley & Sons; 1990.
- Dawson B, Trapp R. *Basic and clinical biostatistics*. 2nda ed. Norwalk: Lange; 1994.
- Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 2nda ed. Massachusetts: PWS Publishers; 1986.
- Stewart J. *Cálculo*. 4ª ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning; 2002.

APÊNDICE B

Documento de aprovação na 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