

Mariana Tosello Laloni

Predição do risco individual de metástase
linfática e hematogênica em função
da intensidade da linfangiogênese no
tumor carcinóide típico broncopulmonar

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Laloni, Mariana Tosello

Predição do risco individual de metástase linfática e hematogênica em função da intensidade da linfangiogênese no tumor carcinóide típico broncopulmonar / Mariana Tosello Laloni. -- 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.Tumores neuroendócrinos/classificação 3.Carcinoma neuroendócrino/classificação 4.Linfangiogênese 5.Vasos linfáticos 6.Neoplasias brônquicas/classificação 7.Metástase neoplásica 8.Marcadores biológicos de tumor/classificação 9.Fatores de risco

USP/FM/SBD-182/08

Dedico este trabalho aos meus
pais, Luiz Antonio e Diana.

Agradecimentos

Ao meu pai, pelo exemplo de força e determinação ao transformar sua dor em coragem e conseguir defender seu doutoramento no momento mais difícil de sua vida. Saudade.

À minha mãe, pelo incentivo diário. Pelo exemplo de vida moral e intelectual. Pela garra e pela humildade. Em quem me espelho todos os dias em busca de meus ideais. Obrigada.

À minha irmã, Isabela, que nos meus momentos de desespero, sempre me amparou com palavras doces. Por você sempre terei um carinho fraterno e eterno.

Ao meu irmão, André, pelo seu exemplo de sucesso.

Aos meus tios, Pedro e Marina, pelo companheirismo e incentivo.

Às minhas queridas amigas e companheiras de todos os dias, Mariana Netto de Oliveira e Danielle Cristina Ovigli Silva Lopes, pela disponibilidade em assumir minhas tarefas para que a conclusão desse trabalho pudesse acontecer. Obrigada por permitir que chorasse em momentos de alegria e tristeza. Estarei sempre ao lado.

Ao amigo Dr. Fernando Moura Silva, pelo incentivo desde o ingresso na pós-graduação até os últimos dias da entrega do manuscrito. Auxiliou-me de forma decisiva nos momentos finais desse trabalho.

Ao Dr. Alberto Carlos Capel Cardoso, pelas palavras duras e doces que me trouxeram mais determinação para a conclusão desse trabalho.

Ao Dr. João Carlos das Neves Pereira, meu co-orientador, apaixonado pela ciência e por pacientes. Agradeço pelo exemplo em ajudar ao próximo sem nunca esperar nada em troca.

Ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas, por todo seu conhecimento na área de anatomia patológica. Por sua dedicação e ajuda ao explicar, ler e se fazer entender entre muitas lâminas e microscópios.

Ao Dr. José Ribas Milanez de Campos, pelo apoio e confiança que depositou em jovens médicos que desenvolveram a linha de pesquisa em carcinóides.

À Dra. Carmen Valente Barbas, médica exemplar, por todas as suas sugestões, críticas e elogios na banca de qualificação.

Ao Dr. Alexandre Muxfeldt Ab'Saber, por sua calma e sabedoria. Por mostrar que podemos escolher ultrapassar as adversidades pelo caminho mais simples.

À Prof^a. Dra. Vera Luiza Capelozzi, pela atenção e dedicação à ciência.

À Dra. Elaine Stabenow, por seu conhecimento e paciência na colaboração da análise estatística.

Ao Dr. Paulo Manuel Pego Fernandes , Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira e Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene verdadeiros professores pelo apoio durante esses quatro anos.

Às funcionárias do laboratório de imuno-histoquímica, Ana Lucia Garippo, Ângela Batista dos Santos, Esmeralda Miristene Eher e Sandra Moraes Fernezlian, pela disponibilidade, ajuda e paciência na elaboração de toda a metodologia para o uso inédito no Brasil do anticorpo LYVE-1.

À Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros de Oliveira, pela organização e disponibilidade em ajudar. O apoio de vocês foi fundamental para a conclusão desse doutoramento. Vocês sempre mostram o caminho das pedras.

Aos meus mentores na minha vida profissional Dr. Rene Claudio Gansl, Dr. Sergio Daniel Simon e Dr. Jacques Tabacof pelo apoio e incentivo. E por toda confiança que sempre depositaram em mim.

A todos os funcionários e médicos do Centro Paulista de Oncologia, em especial ao Dr. Jairo José do Nascimento Sobrinho, à Carolina Di Paula Cantidio e à Maria Eugelia Chiconello, a Mia pelo acolhimento de forma tão generosa e carinhosa durante o período de elaboração desse trabalho.

À Suely Campos Cardoso, bibliotecária da FMUSP, por sua generosidade, conhecimento e gentileza, transformando momentos de desespero em paz.

Aos pacientes e todos os funcionários do Hospital das Clínicas e do Incor, pela generosidade de contribuir e ajudar na realização deste trabalho.

Aos meus pacientes pelo ensinamento de todos os dias.

“Detesto, de saída, quem é capaz de marchar em formação com prazer ao som de uma banda. Nasceu com cérebro por engano; bastava-lhe a medula espinhal.”

(Albert Einstein)

Esta tese está de acordo com:

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Tumor carcinóide broncopulmonar.....	4
2.2. Histórico.....	6
2.3. Classificação.....	7
2.4. Tratamento.....	11
2.4.1. Cirúrgico.....	11
2.4.2. Radioterápico.....	12
2.4.3. Quimioterápico.....	13
2.5. Critérios histológicos de agressividade.....	15
2.5.1. Fenômenos intracelulares.....	16
2.5.2. Fenômenos extracelulares.....	18
2.5.2.1. Fibras do sistema colágeno.....	19
2.5.2.2. Fibras do sistema elástico.....	20
2.5.2.3. Angiogênese.....	21
2.5.2.4. Linfangiogênese.....	22
2.6. Sistema Linfático.....	25
2.6.1. Embriogênese do Sistema Linfático.....	25
2.6.1.1. A teoria centrífuga ou independente.....	25
2.6.1.2. A teoria centrípeta ou conjunta.....	25
2.6.1.3. Evidências para cada teoria.....	26
2.6.2. Anatomia do Sistema Linfático.....	27

2.6.2.1. Os linfáticos pré-coletores, coletores e troncos linfáticos.....	27
2.6.2.2. Linfonodos e tecidos linfóides.....	28
2.6.3. Fisiologia do Sistema Linfático.....	28
2.6.3.1. A propulsão e o circuito da linfa.....	29
2.6.4. Marcadores endoteliais linfáticos.....	30
2.6.4.1. Atividade enzimática.....	30
2.6.4.2. Anticorpos monoclonais.....	31
2.6.4.3. Receptor endotelial de vaso linfático - LYVE-1.....	31
2.6.4.4. Família dos fatores de crescimento endotelial vascular.....	33
2.6.4.5. Podoplanina.....	34
2.6.4.6. Prox-1.....	35
2.7. Envolvimento dos linfáticos nos cânceres.....	35
2.8. Regulação molecular da linfangiogênese no câncer.....	39
2.9. A via do VEGF-C/VEGFR-3.....	40
2.9.1. Outros fatores indutores da linfangiogênese.....	41
2.9.2. A via do VEGF-C é reversível?.....	42
2.9.3. Linfangiogênese e metástase hematogênica.....	43
2.10. Terapias antilinfangiogênicas em câncer.....	45
2.10.1. Possíveis efeitos do bloqueio da linfangiogênese fisiológica.....	46
2.10.2. Drogas antilinfangiogênicas.....	47
2.10.2.1. Drogas em estudo clínico.....	47
2.10.2.2. Drogas em uso na prática clínica.....	48
2.10.2.3. Drogas antilinfangiogênicas em carcinóides.....	49
3. OBJETIVOS DO ESTUDO.....	50
4. CASUÍSTICA e MÉTODOS.....	52
4.1. Parecer da Comissão de Ética.....	53
4.2. Desenho do estudo.....	53
4.2.1. Critérios de inclusão.....	53
4.2.2. Critérios de exclusão.....	54

4.3. Casuística.....	54
4.3.1. Descrição da casuística.....	55
4.3.1.1. Gênero.....	55
4.3.1.2. Localização do tumor em relação à carina.....	55
4.3.1.3. Comprometimento da margem de ressecção do tumor.....	56
4.3.1.4. Estádio “T”	57
4.3.1.5. Linfonodos positivos.....	57
4.3.1.6. Metástase hematogênica	58
4.4. Método.....	59
4.4.1. Confirmação do diagnóstico histológico.....	59
4.4.2. Revisão dos prontuários.....	61
4.4.3. Interpretação do TNM.....	61
4.4.4. Técnica de imuno-histoquímica utilizada para detecção do antígeno LYVE-1, VEGF-C e VEGFR-3.....	62
4.4.5. Determinação dos índices imuno-histoquímicos.....	65
4.5. Análise estatística.....	66
4.5.1. Estatística descritiva.....	66
4.5.1.1. Casuística como caso-controle (com ou sem metástase)	67
4.5.2. Análise multivariada de predição de risco.....	67
5. RESULTADOS.....	69
5.1. Imunomarcagem dos anticorpos.....	70
5.1.1. LYVE-1.....	71
5.1.2. VEGF-C.....	73
5.1.3. VEGFR-3.....	75
5.2. Análise multivariada por comparação de médias.....	77
5.2.1. Gênero X Idade.....	77
5.2.2. Gênero X Diâmetro.....	77
5.2.3. Gênero X Número de linfonodos positivos.....	78
5.3. Comparação entre os grupos com e sem metástase.....	78
5.3.1. Idade.....	79

5.3.2. Diâmetro do tumor.....	79
5.3.3. Gênero.....	80
5.3.4. Localização do tumor.....	80
5.3.5. Margem comprometida.....	80
5.4. Regressão logística.....	81
5.4.1. Regressão logística para prever o “N” operatório.....	81
5.4.2. Regressão logística para prever o “M” operatório.....	81
5.4.3. Regressão logística para prever o “MN” conjunto.....	82
5.5. LYVE-1.....	82
5.5.1. Teste de parametricidade para a variável IPI.....	82
5.5.2. Comparação da mediana do IPI entre o grupo com e sem metástase linfática.....	83
5.5.3. Análise multivariada por regressão logística.....	84
6. DISCUSSÃO.....	85
6.1. Limitações do estudo.....	86
6.2. Desenho epidemiológico.....	86
6.3. Tratamento.....	87
6.4. Tempo de acompanhamento.....	91
6.5. Comprometimento linfático maligno à microscopia.....	92
6.6. Estudo imuno-histoquímico baseado em epítomos.....	93
6.7. Discussão sobre os resultados.....	96
7. CONCLUSÕES.....	102
8. REFERÊNCIAS.....	104

Apêndices

Lista de Abreviaturas

$\alpha 9\beta 1$	Proteína da superfície da membrana celular
5'Nase	5'-nucleotidase
AgNOR	Regiões organizadoras de nucléolos
Akt	Quinase PI-3 dependente da serina-treonina quinase
Ang-1	Angiopoyina 1
AZD2171	Droga em estudo clínico
Bax	Proteína Bax
Bak	Proteína Bak
Bcl-2	Antígeno marcador de células de linfoma B
BSA	Soro Albumina Bovina
C-pro	Porção terminal C
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD14	Catepsina D-14
CD 34	Catepsina D-34
CD 44	Catepsina D-44 - Receptor de ácido hialurônico
CGA	Campos de Grande Aumento
CSF-1R	Receptor do fator de estimulação de colônias Tipo 1
DAB	3-3'-diaminobenzamida
DAPase	Dipeptidil-aminopeptidase IV
DP	Desvio padrão
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
HCFMUSP	Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Continua...

HE	Hematoxilina-eosina
IML	Instituto Médico Legal
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-pro	Porção terminal N
NM	Linfonodos regionais e metástase hematogênica
n	Frequência
NORs	Regiões organizadoras de nucléolo
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína nuclear p53
p	Probabilidade de erro alfa
p.	Página
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação
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
PKC	Via dependente de p42/p44
Pi	Somatória dos pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico
Prox-1	<i>“Prospero-related homeobox gene-1”</i>
P _{tumor}	Somatória do total de pontos que incidem sobre células tumorais

Continua...

PTK 787/ ZK 222584	Droga em estudo clínico
Raf	Proteína Raf
Ras	Oncogene
RNAm	RNA mensageiro
RET	Receptor do fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial
SVO	Serviço de verificação de óbito
SPSS	“Statistical Package for Social Science”
T	Tamanho do tumor primário
Tie-2	Receptor de tirosina quinase
TKRs	Tirosina-quinases ligadas ao receptor
TNM	Sistema internacional de classificação de tumores malignos
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
WHO	World Health Organization

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μm^2	Micrometro quadrado
$\mu\text{m/s}$	Micrometro por segundo
M	Mol
mg	Miligrama
mm	Milímetro
pH	Medida de acidez de uma solução

Lista de Tabelas

Tabela 1: Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos.....	60
Tabela 2: Dados demográficos.....	apêndice 1
Tabela 3: Regressão logística para prever o “M” operatório.....	apêndice 2
Tabela 4: Regressão logística para prever o “NM” conjunto.....	apêndice 3
Tabela 5: P_{tumor}	apêndice 4
Tabela 6: P_{tumor} , P_i e IPI.....	apêndice 5

Lista de Figuras

Figura 1: Carcinóide típico LYVE-1(B941347T) (X200).....	71
Figura 2: Carcinóide típico LYVE-1 (A12331) (X400).....	71
Figura 3: Carcinóide típico LYVE-1 (A12331) (X400).....	72
Figura 4: Carcinóide típico LYVE-1 (966096) (X400).....	72
Figura 5: Carcinóide típico VEGF-C (B941347T) (X400).....	73
Figura 6: Carcinóide típico VEGF-C (922619) (X400).....	73
Figura 7: Carcinóide típico VEGF-C (HC4209710B) (X200).....	74
Figura 8: Carcinóide típico VEGF-C (963131) (X400)	74
Figura 9: Carcinóide típico VEGFR-3(994209) (X200)	75
Figura 10: Carcinóide típico VEGFR-3 (HC4209710B) (X400)	75
Figura 11: Carcinóide típico VEGFR-3 (B941347T) (X200)	76
Figura 12: Carcinóide típico VEGFR-3 (0030812) (X400)	76

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição por gênero.....	55
Gráfico 2 – Localização do tumor.....	56
Gráfico 3 – Comprometimento da margem de ressecção do tumor.....	56
Gráfico 4 – Estádio T.....	57
Gráfico 5 – Comprometimento dos linfonodos por neoplasia.....	58
Gráfico 6 – Presença de Metástase hematogênica.....	58
Gráfico 7 – Teste de parametricidade para LYVE-1.....	83
Gráfico 8 – Comparação da mediana do IPI entre os grupos com e sem metástase.....	84

Resumo

Laloni MT. Predição do risco individual de metástase linfática e hematogênica em função da intensidade da linfangiogênese no Tumor Carcinóide Típico Broncopulmonar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Os tumores carcinóides típicos broncopulmonares 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. Esta análise, porém, é realizada em espécimes histológicos corados pela hematoxilina-eosina, técnica tradicional consagrada, mas que não permite avaliar processos biomoleculares relacionados ao potencial maligno das células que já podem estar presentes e não serem detectados pelo método. Em tumores carcinóides vários estudos já foram realizados na tentativa de identificar o potencial proliferativo de células que ainda não apresentam figuras de mitose, como PCNA, p53, Ki-67, o processo apoptótico (Bcl-2, Bax e Bak), fibras do sistema colágeno e elástico e angiogênese. Entretanto, a linfangiogênese nunca foi estudada. Na última década várias moléculas funcionais e constitucionais que são expressas especificamente nas células do endotélio ou nos podócitos dos vasos linfáticos foram identificadas, como o VEGF-C, VEGFR-3 e o LYVE-1, possibilitando a melhor compreensão da linfangiogênese. Estudamos a imunomarcagem dessas estruturas no carcinóide típico. Pela primeira vez no Brasil, a quantificação de vasos linfáticos foi realizada usando o LYVE1 como marcador. Apesar do uso de vários bloqueios de sítios inespecíficos não foi possível quantificar a expressão do VEGF-C e VEGFR-3 em carcinóides típicos, pois não encontramos controle interno negativo. Houve diferença significativa entre as médias da idade em relação ao gênero. Não houve diferença significativa entre as médias do diâmetro e número de linfonodos acometidos em relação ao gênero. Em relação ao grupo com e sem metástase encontramos diferença significativa em relação ao diâmetro e ao comprometimento da margem. Não houve diferença da mediana do número de vasos linfáticos corados por mil células entre os grupos sem e com metástase linfática. Por regressão

logística identificamos o diâmetro do tumor primário como uma variável independente preditiva do risco de metástase hematogênica e o diâmetro do tumor primário e a localização central ou periférica como variáveis independentes preditivas do risco de qualquer metástase (linfática ou hematogênica). O número de vasos linfáticos corados por mil células não foi identificado pelo modelo de regressão logística como uma variável independente preditiva do risco individual de metástase linfática. Conclui-se que há correlação do diâmetro do tumor com o potencial de metástase hematogênica e há correlação entre diâmetro e localização do tumor primário e a ocorrência de metástase linfática ou hematogênica. A quantificação da imunexpressão do LYVE-1 não demonstrou correlação. Outras técnicas devem ser estudadas e empregadas para identificar a importância da linfangiogênese no carcinóide típico.

Descritores: 1.Tumor carcinóide/classificação 2.Tumores neuroendócrinos/classificação 3.Carcinoma neuroendócrino/ classificação 4.Linfangiogênese 5.Vasos Linfáticos 6.Neoplasias brônquicas/classificação 7.Metástase neoplásica 8.Marcadores biológicos de tumor/classificação 9.Fatores de risco

Summary

Laloni, MT. Individual risk prediction of node and distant metastasis based on lymphangiogenic intensity in typical pulmonary carcinoid tumor.[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 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. This classification is based on Hematoxylin and Eosin stain and this technique can not assess biomolecular processes related to malignant potential. Trying to identify the malignant potential of the carcinoid tumors some studies have already been designed to identify some proteins as PCNA, p53, Ki-67, apoptosis proteins (Bcl-2, Bax and Bak), collagen and elastic fibers as well as angiogenic process. However, the lymphangiogenic mechanism has never been evaluated in typical pulmonary carcinoid tumors. Recently some molecules (VEGF-C, VEGFR-3 and LYVE-1) that are specifically expressed in the endothelium of the lymphatic vessels have been identified. These findings have improved the lymphangiogenic mechanism comprehension. This study used the immunohistochemical technique to identify VEGF-C, VEGFR-3 and LYVE-1 in 182 patients submitted to surgical procedures to treat Typical pulmonary carcinoid tumors. Lymphatic metastasis were diagnosed in 23 of 182 patients and 17 of 182 patients were identified with hematogenic metastasis. Futhermore, this study was the first reported one which has tried to quantify the lymphatic vessels using the LYVE-1 as an immunohistochemical marker. This study could not assess VEGF-C and VEGFR-e expression in Typical pulmonary carcinoids since an internal negative control could not be determined. There was a statistical difference between the median age and gender. There was no statistical difference between the median diameter and the number of positive lymph nodes related to the gender. This study demonstrated a statistical difference between the diameter and positive margins related to the group of patients that have developed metastatic disease and the group of patients with no metatastatic disease. There was no difference between the group of patients that have developed metastatic disease and the group of patients with no metatastatic disease according to the median number of lymphatic vessels stained. Based on logistic regression this study demonstrated that there is a predictive risk of developing hematogenic metastasis related to the diameter

of the tumor. The predictive risk of the lymphatic metastasis was not improved by the number of the immunohistochemical stained lymphatic vessels, according to the logistic regression model. The immunohistochemical expression of LYVE-1 has not demonstrated statistical correlation between the parameters studied. Other than immunohistochemical techniques are required to improve the comprehension of the lymphangiogenic mechanism involved in the Typical pulmonary carcinoid tumor

Key Words: 1.Carcinoid tumors/classification 2.Neuroendocrine tumors/classification 3. Neuroendocrine carcinoma/classification 4. Lymphangiogenesis 5.Lymphatic vessel 6.Bronchial neoplasms/classification 7.Metastasis 8.Tumour biomarkers/classification 9.Risk factor

1 INTRODUÇÃO

“Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Quando Álvaro de Campos, um dos heterônimos mais conhecidos de Fernando Pessoa, escreveu esses versos, não era possível imaginar que o desenvolvimento da ciência na área da oncologia iria avançar de forma rápida e surpreendente.

Nosso grupo de pesquisa surgiu a partir de um ideal do Dr. João Carlos das Neves Pereira, com o intuito de buscar explicações biomoleculares que justificassem o que vemos todos os dias na prática de nossa clínica. Esse grupo cresceu e hoje é uma linha de pesquisa em Carcinóides Broncopulmonares, desenvolvida no Departamento de Cirurgia Torácica e Cardiovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Esse grupo nunca quis ser nada, mas o que era um sonho começa a se tornar realidade. Encontramos mecanismos biomoleculares que podem explicar as diferentes evoluções dos doentes com carcinóides broncopulmonares, e assim, em um futuro próximo, individualizar e aprimorar o tratamento desta doença.

A disseminação de células tumorais é responsável pela maioria das mortes por câncer e é mediada por inúmeros mecanismos, que incluem

invasão local do tecido que circunda o tumor, disseminação linfática e disseminação hematogênica.

Observações clínicas e anatomopatológicas sugerem que, para muitos tumores sólidos, a via inicial e mais comum de disseminação é a linfática, através dos linfáticos aferentes, seguindo assim a rota natural de drenagem do território que envolve o tumor.

Entretanto, o sistema linfático ficou tradicionalmente esquecido e encoberto pelas descobertas sobre o sistema vascular sangüíneo. Em parte, isso ocorreu porque não existiam marcadores específicos para fazer distinção entre o endotélio linfático e o sangüíneo. Também não existia a identificação de fatores de crescimento específicos para vasos linfáticos.

Nos últimos anos essas limitações foram minimizadas pela descoberta de um número pequeno de potentes marcadores específicos para células endoteliais linfáticas

A partir dessas descobertas intensificou-se a busca pela compreensão do desenvolvimento da rede linfática e qual é seu papel do processo de disseminação de células neoplásicas.

O avanço foi tão grande que já existe em estudos de fase III, com drogas que inibem a via linfática, inibindo assim a linfangiogênese.

Determinar o papel da a linfangiogênese em tumores carcinóide típico broncopulmonar é o foco deste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tumor carcinóide broncopulmonar

Os tumores carcinóides broncopulmonares compreendem proliferações que apresentam características bioquímicas e morfológicas de células do sistema neuroendócrino difuso³, são derivadas das células do epitélio brônquico, denominadas células de Kulchitsky^{4,5,6}. Eram consideradas adenomas e acreditava-se que não tinham potencial para disseminação hematogênica e linfática. É cada vez mais freqüente, porém o relato da ocorrência de metástase em indivíduos acometidos pela doença^{7,8,9}.

Nas últimas décadas foi identificado um aumento crescente no número de diagnósticos de carcinóide broncopulmonar, já representando cinco por cento das neoplasias pulmonares^{3,10,11}. Esse aumento pode estar relacionado à maior incidência ou maior acurácia diagnóstica.

Quanto à faixa etária, o tumor carcinóide típico acomete preferencialmente indivíduos jovens, enquanto o atípico acomete preferencialmente indivíduos em idade mais avançada. A diferença das médias de idade entre indivíduos com a variante típica e atípica é de aproximadamente 10 anos em nosso ambulatório. Nota-se maior incidência de carcinóides típicos no gênero feminino, enquanto a incidência de carcinóides atípicos é maior no gênero masculino¹².

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.

Sabe-se que pacientes operados de tumores carcinóides típicos podem ir a óbito em decorrência de metástases linfáticas ou hematogênicas, em uma doença que ainda hoje é considerada de baixo grau de agressividade.

2.2 Histórico

Provavelmente a primeira descrição de um paciente portador de tumor carcinóide broncopulmonar data de 1831. Laënnec¹³, ao desenvolver o estetoscópio, descreveu detalhadamente a ausculta de um pulmão atelectasiado por uma lesão endoluminal de crescimento lento, que gerava pneumonias de repetição, tosse e hemoptise em uma mulher jovem não tabagista.

Em 1888, Lubarsch descreveu múltiplos tumores carcinóides no íleo distal de dois pacientes submetidos à necropsia¹⁴. Esse foi o primeiro relato com prova histológica de tumor carcinóide.

Oberndorfer¹⁵, em 1907, descreveria tumores histologicamente similares aos carcinomas, porém com comportamento indolente e, portanto, menos agressivos, denominando-os como carcinóide (*“karzinoide”*). Esses tumores carcinóides inicialmente foram descritos no trato respiratório e digestivo. Hoje sabemos que se desenvolvem em vários tecidos.

2.3 Classificação

Somente após quase meio século da sua primeira descrição histológica foi apresentado por Engelbreth-Holm a primeira distinção entre tumor carcinóide típico e atípico¹⁶. E foi em 1972 que Arrigone e colaboradores apresentaram critérios histológicos para separar os carcinóides em dois grupos histológicos: típico e atípico¹⁷. Desde então, a classificação dos tumores neuroendócrinos visa a agrupar os tumores segundo suas características histológicas.

Os tumores neuroendócrinos compreendem um vasto grupo de proliferações celulares: as hiperplasias neuroendócrinas; os tumores carcinóides típicos, de baixo grau de malignidade; os tumores carcinóides atípicos, de grau intermediário de malignidade; os carcinomas neuroendócrinos de células grandes e de células pequenas, de alto grau de malignidade¹⁸. Entretanto as classificações sugeridas e utilizadas desde então foram intensamente discutidas, pois os critérios sugeridos algumas vezes eram subjetivos e não condiziam com a evolução clínica observada. Pacientes com diagnóstico de tumores tidos como de baixa malignidade apresentavam metástase e até evoluíam a óbito em contraponto a pacientes com tumores classificados como de alta agressividade que apresentavam evolução favorável^{19,20}.

Até o início da década de oitenta os tumores carcinóides eram considerados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como adenomas.

A partir de vários relatos de pacientes com metástases linfáticas e hematôgenicas^{19,21} a OMS reconsiderou a classificação.

Em 1982 passou a considerar os tumores neuroendócrinos como neoplasias malignas²² e classificou os tumores neuroendócrinos em dois grandes grupos: tumores carcinóides (típico e atípico) e os carcinomas pulmonares de células pequenas e de células grandes. Essa divisão permanece a mesma, apesar da revisão de 2004²³.

A classificação atual divide os tumores carcinóides, conforme o grau histológico de malignidade em típico e atípico^{17,24}. Esta análise, porém, é realizada em espécimes histológicos corados pela hematoxilina-eosina, técnica tradicional consagrada, mas que não permite avaliar processos biomoleculares relacionados ao potencial maligno das células que já podem estar presentes e não serem detectadas pelo método.

A classificação agrupa as proliferações de acordo com o índice mitótico (número de mitoses em 10 campos microscópicos de maior aumento à coloração pela hematoxilina-eosina), relação volumétrica núcleo/citoplasma, presença ou ausência de necrose, pleomorfismo nuclear e invasão vascular^{23,25}.

Os tumores neuroendócrinos são derivados de células neuroendócrinas, que estão presentes em todo o epitélio broncopulmonar, em qualquer segmento das vias aéreas, preferencialmente nos brônquios principais e lobares e raramente nas regiões periféricas e carinal^{26,27}. Estas células estão presentes de forma isolada ou em grupo, denominadas de células e corpos de Kulchitsky, respectivamente^{8,28}.

As células de Kulchitsky são quimiorreceptores das pressões parciais de gases alveolares e sangüíneos²⁹. Em resposta às baixas pressões de oxigênio e a altas pressões de gás carbônico proliferam^{30,31,32}.

Qualquer processo que desencadeie resposta inflamatória no tecido broncopulmonar, como as neoplasias e infecções, por mecanismo ainda desconhecido, podem proporcionar hiperplasia das células de Kulchitsky^{33,34}.

O agrupamento das células de Kulchitsky com diâmetro inferior a 5 mm é denominado pelos patologistas de “*tumorlets*”. Se esse agrupamento ultrapassar os 5 mm são arbitrariamente classificados como tumores carcinóides típicos³⁵.

Não existem evidências de que as hiperplasias sejam lesões pré-malignas. As proliferações neoplásicas são consideradas independentes³². Portanto, definir o tumor carcinóide baseado em diâmetro é arbitrário³⁶, pois identificamos na prática, comportamentos distintos, reforçando o conceito de que hiperplasia não é lesão pré-maligna. E que os indivíduos que desenvolvem metástases apresentam proliferação celular distinta das hiperplasias.

O tumor carcinóide típico é uma neoplasia pulmonar bem diferenciada e não está relacionada ao tabaco e a fatores ambientais conhecidos³. Apresenta baixo índice mitótico, ausência de necrose e pleomorfismo local, não se observando qualquer sinal de malignidade à análise histológica tradicional sob a coloração pela hematoxilina-eosina.

Os tumores carcinóides atípicos são moderadamente diferenciados, apresentam maior índice mitótico (2 a 10 mitoses por campo de grande

aumento), maior relação núcleo/citoplasma, nucléolos evidentes e necrose tumoral em focos esparsos^{7,9,23,24}. Portanto, possuem características histopatológicas de malignidade e são facilmente aceitos como verdadeiros carcinomas na prática clínica^{17,20,37,38}.

Outras proliferações neoplásicas, de alto grau de malignidade, das células neuroendócrinas do tecido broncopulmonar também são descritas: o carcinoma neuroendócrino de células grandes e o carcinoma de células pequenas^{39,40}.

As diferentes classificações sempre tentaram agrupar os tumores de acordo com seus padrões histológicos para predizer seus prognósticos^{41,42,43,44}. A classificação do carcinóide é baseada apenas no padrão histológico, pela coloração tradicional pela hematoxilina-eosina e é insuficiente para predizer o risco de metástase linfática e hematogênica. Em alguns casos de tumores classificados como carcinóides típicos, a malignidade só é determinada tardiamente quando metástases hematogênicas já são encontradas e o doente já foi submetido, muitas vezes, a uma ressecção conservadora não-oncológica⁴⁵.

Apesar dos esforços na tentativa de estabelecer uma classificação histológica baseada nos critérios clássicos para determinar malignidade, ainda existe uma grande variação no comportamento clínico entre indivíduos acometidos pelo tumor carcinóide típico. Faz-se, assim, imperativa a busca de características que possam diagnosticar subgrupos de pacientes com risco aumentado de desenvolver metástase linfática ou hematogênica. Dessa forma, será possível a predição do risco individual para esses

fenômenos e o oferecimento de um tratamento personalizado mais adequado a cada doente.

2.4 Tratamento

2.4.1 Cirúrgico

O tratamento clássico para os tumores carcinóides típicos é a ressecção cirúrgica²⁵.

A extensão da ressecção varia desde a enucleação e ressecções em cunha^{25,46,47,48,49} até ressecções de todo o lobo com esvaziamento linfático hilar e mediastinal ipsilaterais, realizadas apenas em alguns serviços e normalmente nos casos de tumores carcinóides atípicos^{50,51}.

Porém, mesmo os tumores carcinóides típicos, lesões consideradas bem diferenciadas, podem cursar com metástases linfáticas e hematogênicas em até 15% dos casos, com mortalidade de até 10% em 5 anos^{11,24,52,53,54,55}. Essa constatação obriga a classe médica a propor abordagens terapêuticas mais eficazes.

O tratamento cirúrgico dos carcinomas neuroendócrinos não é semelhante às ressecções oncológicas para carcinomas pulmonares não neuroendócrinos. Para os carcinóides típicos, na maioria dos serviços, é aceita a ressecção econômica (enucleação, ressecção em manga ou cunha), sem dissecação linfática hilar ou mediastinal⁴⁸.

O ideal, porém, não é oferecer indiscriminadamente um mesmo tratamento para todos os portadores de tumor carcinóide típico broncopulmonar, mas sim predizer o risco individual de metástase linfática e orientar a extensão da ressecção para cada doente. Vale ressaltar que a maioria dos tumores carcinóides típicos é endoluminal e pode ser biopsiada por broncoscopia, e que esses espécimes são passíveis de análise imuno-histoquímica já no período pré-operatório.

2.4.2 Radioterápico

A radioterapia convencional não é uma modalidade de tratamento utilizada para os tumores carcinóides ou para a síndrome carcinóide. Esse recurso terapêutico é utilizado apenas para tratamento paliativo de lesões focais que requerem controle dos sintomas locais. As lesões ósseas metastáticas são as mais tratadas com radiação.

Atualmente, já em uso na prática clínica em serviços do norte da Europa, pode-se lançar mão da microrradioterapia intracelular sob os preceitos da terapia alvo. Nesta modalidade terapêutica isótopos citotóxicos são carregados às células malignas com o auxílio de análogos de somatostatina administrados de forma endovenosa^{56,57,58}.

2.4.3 Quimioterápico

O tratamento sistêmico com agentes quimioterápicos convencionais mostrou mínimo benefício clínico nas últimas décadas.⁵⁹

O uso da quimioterapia nos tumores carcinóides é limitado, pois sua atividade no tumor primário, nas metástases hematôgenicas e nos sintomas da síndrome carcinóide é pouco efetiva e com inúmeros efeitos colaterais.

A quimioterapia pode ser empregada tanto para redução do volume tumoral, quanto para o controle da liberação de hormônios e peptídeos que provocam os sintomas da síndrome carcinóide.

A quimioterapia, por causa da sua toxicidade, compromete a qualidade de vida do paciente, controla pobremente os sintomas da síndrome carcinóide e das disfunções orgânicas provocadas pelo tumor e reduz minimamente o volume tumoral.

Essa abordagem terapêutica se restringe aos pacientes com doença em que o volume tumoral compromete a função do órgão envolvido ou em pacientes com graves e incontroláveis sintomas da síndrome carcinóide e que não responderam as outras modalidades de tratamento.

Estudos clínicos controlados e randomizados são difíceis de serem conduzidos devido à incidência e evolução dessa doença. Entretanto, alguns grupos cooperativos conseguiram estudar a taxa de resposta tumoral com algumas drogas quimioterápicas usadas isoladamente ou em combinações. Na década de 1970, alguns autores referiam que o uso de quimioterapia com 5-Fluouracil e Streptozocina usados isoladamente, mostrava atividade

no controle do volume tumoral e dos sintomas da síndrome carcinóide⁶⁰. Nessa mesma década a Clínica Mayo publicou sua experiência com mais de 200 pacientes que usaram outras drogas, como a doxorrubicina e a dacarbazina. Com reduzidas taxas de resposta em monoquimioterapia (nunca superiores a 25%) uma série de estudos randomizados com combinação de drogas foi conduzida, na tentativa de aumentar as taxas de redução do volume tumoral e de controle dos sintomas da síndrome carcinóide⁶¹.

A Clínica Mayo mostrou que 33% dos pacientes apresentaram resposta parcial quanto à redução do volume tumoral no uso da combinação de 5-Fluouracil e Streptozotocina, em uma série com 43 pacientes⁶¹.

O Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), em um estudo fase III, comparou 5-Fluouracil e Streptozotocina com Ciclofosfamida e Streptozotocina, mostrando taxa de resposta de 33% versus 26% para redução do volume tumoral, sem diferença estatística⁶². Os dados de sobrevivência global também não mostraram diferença entre os dois esquemas.

Em um estudo randomizado com 208 pacientes, o ECOG mostrou que a taxa de resposta (redução do volume tumoral e de controle dos sintomas da síndrome carcinóide) das associações com 5-Fluouracil e Streptozotocina e 5-Fluouracil e doxorrubicina foram 13% e 16%, respectivamente⁶³. Os pacientes que apresentavam contra-indicação cardiológica para o uso desses dois esquemas eram alocados em um terceiro grupo que recebeu dacarbazina. Nesse grupo a taxa de resposta foi

de 10%. Apesar de não haver diferença estatística na taxa de resposta das duas combinações de quimioterapia, a média de sobrevivência foi maior no grupo que recebeu Streptozotocina (24 meses versus 16 meses, com $p = 0.11$)⁶³. Essa disparidade entre a resposta e a sobrevivência pode indicar que a redução do volume tumoral e o controle dos sintomas não se correlacionam com a sobrevivência, e dessa forma, a sobrevivência deve ser usada como medida para avaliar a resposta ao tratamento. Portanto, o maior e único estudo randomizado controlado realizado pelo ECOG com uma casuística com mais de 200 pacientes, mostrou que a taxa de resposta à quimioterapia (redução do volume tumoral e controle dos sintomas da síndrome carcinóide) é muito baixa, não ultrapassando 16% e que isso não traz impacto na sobrevivência dos pacientes com carcinóides⁶³. Alternativas de tratamento devem ser buscadas.

Atualmente é desenvolvido no Instituto Gustave Roussi, em Villejuif, na França, a microquimioterapia intracelular guiada por análogos de somatostatina. Polímeros de drogas quimioterápicas são carregados pelos análogos e, ainda por meio destes, internalizados somente nas células tumorais.

2.5 Critérios histológicos de agressividade

Os critérios histopatológicos clássicos como: atipia celular, presença de necrose e a fração do número de células que apresentam mitose foram considerados suficientes por muito tempo para definir o potencial de

agressividade de uma neoplasia^{17,20,37,38}. Entretanto, alguns fenômenos biomoleculares relacionados ao potencial metastático ou invasivo, detectáveis por métodos imuno-histoquímicos ou de análise morfológica ou fisiológica do genoma celular, não se traduzem precocemente no fenótipo histológico clássico do tumor à coloração pela hematoxilina-eosina^{6,9,64,65,66}.

O potencial proliferativo de células que ainda não apresentam figuras de mitose^{40,67}, a integridade das proteínas de reparo do genoma⁶⁸, a capacidade de indução de apoptose em células indiferenciadas malignas, a eficácia de células tumorais em avançar através das fibras da matriz extracelular⁶⁹, de escaparem ao ataque de células do sistema imunológico e a eficácia das células tumorais em induzirem angiogênese e linfangiogênese, complementam a análise clássica do potencial de agressividade^{70,71,72}.

2.5.1 Fenômenos intracelulares

A quantificação da expressão imuno-histoquímica de fenômenos intracelulares, em nosso meio, já foi utilizada na tentativa de estabelecer o grau de agressividade dos tumores carcinóides típicos e seu potencial metastático.

A pesquisa de marcadores de proliferação celular com anticorpos contra epítomos de proteínas nucleares como o PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) e a proteína nuclear Ki-67 (Ki-67)^{73,74,75} já demonstrou

correlação com o índice mitótico e relação com o comportamento agressivo de carcinomas neuroendócrinos^{12,76,77}.

A detecção e quantificação da proteína nuclear p53 (p53), que tem a capacidade de detectar danos à molécula de DNA, que compromete a integridade celular^{78,79}, também pode ser empregada na pesquisa do potencial de agressividade dos tumores carcinóides. É necessário que o p53 esteja presente na sua forma ativa^{80,81,82} para exercer sua função de “guardião do genoma”. Níveis elevados da expressão imuno-histoquímica do p53 estão relacionados à presença de população de moléculas inativas e com mutação, que possuem vida média mais longa que a de suas correlatas selvagens^{67,83}.

Diariamente, em todos os seres vivos, no processo de duplicação celular são geradas células com características neoplásicas com lesão estrutural ou funcional de seu genoma. Entretanto, a maquinaria biomolecular íntegra é capaz de reconhecer essas células com mutação e corrigir o erro através de mecanismos de autocontrole, evitando assim que as mesmas continuem a se proliferar, podendo desenvolver tumores⁸⁴. As células com mutação podem morrer por apoptose (via intrínseca ou extrínseca), anoikis ou necrose⁸⁵. O processo apoptótico envolve várias macromoléculas em cascata, sendo indispensável a participação de proteínas da família do Bcl-2, como a Bax e Bak⁸⁶, além das asparaginases da porção C-terminal, as C-asparaginases (ou caspases)^{87,88}. A proteína citoplasmática Bcl-2 e a Bax participam do processo de apoptose pela via intrínseca, ou morte programada dependente da mitocôndria, elas interagem

formando estruturas quaternárias que regulam a liberação de citocromo do interior destas organelas⁸⁶. O equilíbrio entre Bcl-2 e Bax é que determina o processo de apoptose pela via intrínseca. Essas moléculas podem ser quantificadas por imuno-histoquímica, contribuindo para a avaliação do potencial de malignidade do tecido tumoral.

2.5.2 Fenômenos extracelulares

A matriz extracelular não é apenas um substrato anatômico inerte, mas está em transformação e interação constante com as células do parênquima de tecidos saudáveis e patológicos^{89,90,91}. Nos tecidos tumorais malignos as interações entre a matriz e as células neoplásicas são indispensáveis para determinar a capacidade de proliferação tumoral, seu potencial invasivo e metastático^{92,93,94}.

Através da membrana basal do epitélio, as macromoléculas matriciais, como as fibras do sistema colágeno, como o colágeno maduro tipo IV, a laminina, as fibras do sistema elástico ou a fibronectina, exercem verdadeiras barreiras mecânicas à invasão de células neoplásicas^{20,95,96,97,98}. O rompimento mecânico da membrana basal é um fenômeno indispensável e inicial para a invasão de células tumorais em tecidos adjacentes⁹³, onde se encontram vasos sanguíneos e linfáticos, além de suas estruturas nervosas⁹⁹.

A neoformação de vasos sanguíneos e linfáticos é estimulada e inibida constantemente por mediadores produzidos pelas células

neoplásicas. Sua formação é indispensável para nutrição e crescimento tumoral, bem como para a ocorrência de metástase¹⁰⁰.

2.5.2.1 Fibras do sistema colágeno

A integridade da membrana basal é o que determina se a célula neoplásica pode ser considerada como tendo potencial invasivo. O colágeno tipo IV é o principal componente dessa membrana. Ao transpassar a estrutura, as células neoplásicas entram em contato com os vasos sanguíneos e linfáticos, podendo em alguns casos através dessas vias gerar metástases^{90,95,101}.

Recentemente alguns estudos demonstraram que o colágeno tipo IV tem capacidade antiangiogênica no parênquima tumoral adjacente. Enzimas produzidas pelas células neoplásicas degradam a membrana basal¹⁰². Ao expor as fibras colágenas acontece a interação delas aos componentes extracelulares das macromoléculas transmembranas. Essa interação resulta na diminuição do sinal pró-angiogênico celular⁶⁵.

Um estudo em nossa linha de pesquisa, sobre o papel da heparanase nos tumores carcinóides típicos e atípicos, corroborou a hipótese de que a digestão das macromoléculas matriciais é fator indispensável para a ocorrência de invasão de tecidos adjacentes.

Os mecanismos biomoleculares de regulação do sistema de fibras colágenas interagem com o conjunto de fenômenos que determinam a neoformação de vasos linfáticos intratumorais.

2.5.2.2 Fibras do sistema elástico

As fibras do sistema elástico estão dispostas no compartimento extracelular, bem como as fibras do sistema colágeno, a laminina, a fibronectina, o sulfato de heparan entre outros¹⁰³. O pulmão é, por excelência, um órgão rico em fibras elásticas¹⁰⁴.

A manutenção e remodelação da matriz é o resultado do equilíbrio entre a produção e degradação de seus componentes¹⁰⁵. O desequilíbrio de qualquer um dos processos de manutenção resulta no desaparecimento ou acúmulo de componentes matriciais^{97,106,107}. A cicatrização é o processo mais conhecido, com deposição de fibras e fibroblastos na área reparada¹⁰⁴.

O tecido tumoral também causa desbalanço nas fibras da matriz^{107,108,109}, resultando em acúmulo ou diminuição destes componentes⁹⁸. Algumas células neoplásicas podem produzir enzimas capazes de digerir fibras do sistema colágeno, sistema elástico, sulfatos de heparan, laminina, ou qualquer outra macromolécula, abrindo assim, caminho através dos tecidos, caracterizando um fenótipo invasivo, que é o passo indispensável para a aquisição da capacidade metastática^{98,110,111}.

O tumor também pode provocar anabolismo dos componentes da matriz celular no interstício que circunda o tumor^{107,109,112}. Esse fenômeno é bem conhecido ao redor dos carcinomas. A reação das fibras dos sistemas colágeno e elástico é chamada de reação desmoplásica e elastótica, respectivamente. Portanto as reações desmoplásica e elastótica são consequência do processo neoplásico e não causa^{108,113,114}.

Essas reações são observadas em diversos tipos de tumores, porém seu significado biológico é diverso e até mesmo antagônico, dependendo do órgão de origem do tumor. Ela é medida através do fenômeno da elastose^{107,108}, ou seja, pelo depósito focal destas fibras. Nos tumores de pulmão existe correlação com o prognóstico⁹⁷. Em outras localizações, como na mama, a elastose já foi relacionada com o grau de diferenciação e de invasão^{110,112}.

Tanto a neoformação de vasos linfáticos quanto a progressão espacial da célula até os mesmos, são fenômenos intimamente relacionados aos processos biomoleculares matriciais.

2.5.2.3 Angiogênese

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sangüíneos e linfangiogênese é a formação de novos vasos linfáticos¹¹⁵. Para o suprimento das células neoplásicas, o tecido tumoral necessita de novos vasos arteriais e venosos para suprir sua necessidade metabólica e drenar seus resíduos respectivamente^{116,117}.

O marcador de angiogênese mais utilizado na prática clínica é a catepsina D-34 (CD34). Através da técnica de imuno-histoquímica, esse anticorpo se liga a epítomos de moléculas constitutivas de células endoteliais dos vasos sangüíneos neoformados, mas não dos vasos sangüíneos normais¹¹⁸.

Na última década a neoangiogênese foi exaustivamente estudada. Sabe-se que a neoangiogênese, tanto sangüínea quanto linfática, é um fenômeno intimamente ligado ao aumento da massa tumoral e pode estar correlacionada com a ocorrência de metástases^{118,119,120,121}. Por isso, as citocinas responsáveis por esse processo estão sendo amplamente estudadas e tornaram-se alvo de investigações quanto ao seu papel em determinar o potencial invasivo e metastático e também para o estabelecimento de terapias antiangiogênicas. Portanto, reconhecer o mecanismo molecular que regula a formação de novos vasos patológicos sangüíneos e linfáticos é de extrema importância.

2.5.2.4 Linfangiogênese

Metástase, disseminação de células neoplásicas a partir do tumor primário para linfonodos e órgãos por via hematogênica, é o evento mais relacionado à qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes oncológico.

Vários caminhos podem contribuir para a disseminação de células neoplásicas: invasão local de tecidos e estruturas adjacentes ao tumor primário, metástase hematogênica e metástase linfática (drenagem de células neoplásicas pelos vasos linfáticos para linfonodos e, em alguns casos, finalmente para órgãos por via hematogênica).

Os primeiros relatos do envolvimento de células linfáticas na evolução das neoplasias datam do século dezesseis. O cirurgião francês Le Dran descreveu que os pacientes com linfonodos axilares comprometidos por

neoplasia de mama apresentavam pior evolução e menor sobrevivência quando comparados aos pacientes com tumor restrito às glândulas mamárias¹²². Após mais de duzentos anos destes relatos, Halsted passou a realizar cirurgia radical com exérese da mama, da musculatura peitoral e da cadeia linfática axilar para pacientes com neoplasia de mama com o intuito curativo dessa doença¹²².

Somente na década de cinqüenta, do século passado, foram feitos avanços em relação ao envolvimento linfático em diversos tipos de câncer. Iniciou-se o uso de injeções de radioisótopos para mapear e entender qual era a drenagem linfática do órgão acometido pela neoplasia¹²³. Ou seja, somente após quase trezentos anos, foi possível identificar potenciais rotas de disseminação de células neoplásicas pelo sistema linfático.

Na década de noventa aprimorou-se a técnica de mapeamento da drenagem linfática de um tumor primário de localização conhecida e a identificação de seu linfonodo sentinela. Esse linfonodo possui maior probabilidade de conter células neoplásicas provenientes do tumor primário¹²⁴.

Desde o início do século vinte, a ausência do conhecimento de marcadores específicos para o endotélio linfático neoformado, ou mesmo constitucional retardou a pesquisa sobre o desenvolvimento dessas estruturas e sobre a linfangiogênese¹²⁵. Na última década várias moléculas funcionais e constitucionais que são expressas especificamente nas células do endotélio ou nos podócitos dos vasos linfáticos foram identificadas¹²⁶. A descoberta dessas moléculas possibilitou o desenvolvimento da pesquisa

dos mecanismos moleculares envolvidos na formação desses vasos e do papel da linfangiogênese nos tecidos normais e patológicos¹²⁷. O desenvolvimento recente de métodos cito e histoquímicos, utilizando marcadores específicos para vasos linfáticos, possibilitou a diferenciação desses em relação aos capilares sanguíneos¹²⁶.

A técnica de identificação dos vasos linfáticos possibilitou a confirmação de que estes são fundamentais para o desenvolvimento das metástases e de outros processos patológicos. A partir dessa descoberta intensificou-se a pesquisa clínica e científica em relação à sua importância e a busca de alvos terapêuticos em oncologia.

A descoberta-chave que possibilitou o avanço do estudo sobre linfangiogênese foi o reconhecimento da família dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF - "*Vascular Endothelial Growth Factor*") e de seus receptores (VEGFR - "*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*"). As pesquisas prosseguiram e novas moléculas específicas para identificar vasos linfáticos foram descobertas, como o receptor endotelial de vaso linfático (LYVE-1 - "*Lymphatic Vessel Endothelial Receptor -1*") e a podoplanina.

2.6 Sistema Linfático

2.6.1 Embriogênese do Sistema Linfático

Existem duas teorias propostas para o desenvolvimento da linfangiogênese: a centrífuga (ou *de novo*) que é a formação a partir dos sacos linfóides no mesênquima, independentemente do sistema venoso; e a teoria centrípeta ou origem conjunta com o sistema venoso.

2.6.1.1 A teoria centrífuga ou independente

A teoria centrífuga (ou *de novo*) afirma que nos estágios iniciais do desenvolvimento dos linfáticos, os sacos linfóides se desenvolvem independentemente do endotélio venoso, e através das células endoteliais espalhadas nos tecidos e órgãos adjacentes formam a rede linfática¹²⁸.

2.6.1.2 A teoria centrípeta ou conjunta

A teoria centrípeta afirma que as células dos espaços perivenosos no tecido mesenquimal se tornam achatadas, formando pequenos lumens que coalescem entre si formando os vasos linfáticos, que crescem em direção ao centro¹²⁸.

2.6.1.3 Evidências para cada teoria

Existem evidências científicas que dão suporte às duas teorias. Em ambas, a formação dos sacos linfóides é o primeiro passo para a formação do sistema linfático, entretanto permanece não esclarecido se os linfáticos se diferenciam a partir das veias ou dos espaços dos tecidos mesenquimais¹²⁸.

A rede de vasos linfáticos primitiva, com finas paredes, inicia-se na derme superficial da pele do embrião, em sacos linfóides em fundo cego também chamados de capilares linfáticos ou linfáticos iniciais^{129,130}.

Filamentos de fibras contráteis do sistema colágeno ancoram as células endoteliais linfáticas na matrix extracelular. A contração desses filamentos permite a expansão do volume do fluido intersticial, criando fenestrações intercelulares temporárias¹³¹. A ausência de membrana basal desses capilares facilita a entrada de fluido, restaurando o volume intersticial normal. Os filamentos contráteis das fibras do sistema colágeno se afrouxam e as células endoteliais voltam a sua posição de descanso¹³². Alguns estudos sugerem que a matrix extracelular pode sinalizar e estimular outras alterações ao redor dos linfáticos iniciais contribuindo para a drenagem do fluido intersticial¹³².

2.6.2 Anatomia do Sistema Linfático

O sistema linfático consiste na rede de capilares linfáticos, que absorve o fluído dos espaços intersticiais, dos linfonodos e dos linfáticos coletores. O sistema linfático drena a linfa através do ducto torácico de volta para a circulação sangüínea através da veia subclávia^{127,128}.

Os capilares linfáticos, ao contrário dos capilares sangüíneos, apresentam uma membrana basal pouco desenvolvida, descontínua e altamente permeável¹²⁸. Essas características permitem que o sistema linfático regule várias funções biológicas como: manter a homeostase do fluido intersticial e do volume plasmático e transportar macromoléculas (proteínas, glicídios e lipídios) e células do sistema imune de volta para a circulação sangüínea^{127,128}. O sistema linfático chega a devolver para o sistema circulatório cerca de 10% do volume intersticial que escapa do leito dos capilares sangüíneos¹³³.

2.6.2.1 Os linfáticos pré-coletores, coletores e troncos linfáticos

Os sacos linfóides drenam a linfa para os vasos linfáticos pré-coletores, localizados na derme profunda. Esses vasos em alguns segmentos apresentam válvulas, membrana basal e células musculares lisas¹³⁴. Esses segmentos se alternam com segmentos que apresentam a

mesma morfologia dos sacos linfóides. Os linfáticos pré-coletores drenam a linfa para os linfáticos coletores localizados no tecido subcutâneo. Os linfáticos coletores apresentam células musculares lisas em sua circunferência e válvulas intraluminais regulares. Seu diâmetro é maior que 200 µm. Apresentam também íntima semelhante aos capilares arteriais, média e adventícia¹³⁵, entretanto não apresentam pericito¹³⁶. Os linfáticos coletores coalescem em troncos linfáticos que desembocam no ducto torácico.

2.6.2.2 Linfonodos e tecidos linfóides

Pouco se sabe sobre o desenvolvimento dos linfonodos e de outros tecidos linfóides. Essas estruturas se desenvolvem a partir da protusão de tecido conectivo em sacos embrionários linfóides. Esses sacos formam os primeiros tecidos linfáticos nos locais onde os linfonodos se formarão. Esse processo acontece através da diferenciação de células mesenquimais em células estromais^{137,138}.

2.6.3 Fisiologia do Sistema Linfático

Proporcionar o retorno de macromoléculas ao sistema venoso que não seriam reabsorvidas devido ao seu diâmetro permite que a pressão coloido-osmótica do fluido intersticial permaneça estável. Falhas do sistema linfático em manter constante o volume do fluido intersticial e a pressão

coloido-osmótica resultam em edema. Não menos importante é a capacidade de transportar células do sistema imune para os locais de ação das mesmas e a capacidade dos linfonodos de exercerem a função de filtro dos patógenos que atingem o sistema linfático. Os linfonodos são estruturas altamente especializadas. Neles o sistema linfático se comunica com o sistema venoso e as células do sistema imune residem, migram e se desenvolvem¹³³.

2.6.3.1 A propulsão e o circuito da linfa

A propulsão da linfa acontece a uma velocidade de 10 $\mu\text{m/s}$ devido a uma combinação do movimento intrínseco da parede do linfático coletor e da compressão realizada pela pulsação das artérias adjacentes e pela contração dos músculos esqueléticos^{139,140,141}.

A linfa passa por vários linfonodos ou outros órgãos linfáticos (agregações linfóides nas mucosas gástricas e respiratórias, como as placas de Peyer e as tonsilas)¹³⁷. Antes de passarem abaixo da cápsula do linfonodo os ductos aferentes dividem-se em sinusóides corticais e passam pelas células reticuloendoteliais que agem como filtro¹³⁷. Nos linfonodos células apresentadoras de antígeno apresentam epítomos dos antígenos para os linfócitos, desencadeando uma resposta imunológica¹³⁸. A linfa continua através dos sinusóides medulares para a região hilar do linfonodo e segue para os ductos eferentes. Células neoplásicas podem ficar retidas e

se proliferarem nos linfonodos ou se disseminarem para órgãos por via hematogênica¹²².

2.6.4 Marcadores endoteliais linfáticos

2.6.4.1 Atividade enzimática

Existem enzimas predominantes, ou mesmo específicas, para o endotélio e podócitos dos vasos dos leitos sangüíneos arteriais e venosos e do leito linfático.

Entre as várias enzimas encontradas nas células endoteliais linfáticas a 5'-nucleotidase (5'Nase) difere sua atividade em relação aos vasos sangüíneos. Métodos histoquímicos para detectar a 5'Nase são efetivos em identificar capilares linfáticos^{125,142}.

Como a atividade de fosfatase alcalina (FA) tende a ser baixa em vasos linfáticos e altas em algumas artérias, a dupla coloração 5'Nase-FA distingue vasos linfáticos de arteriais em animais sadios¹⁴³. A atividade da enzima dipeptidil-aminopeptidase IV (DAPase) é baixa em vasos linfáticos e mais alta em veias do que em artérias. Portanto a tripla coloração 5'Nase-FA-DAPase pode diferir linfáticos de artérias e veias¹⁴⁴.

2.6.4.2 Anticorpos monoclonais

Para identificar epítomos de moléculas do endotélio dos vasos linfáticos pode-se utilizar um anticorpo específico, produzido para esse propósito. Foi desenvolvido um anticorpo contra antígenos do endotélio do ducto torácico de rato. Foi também utilizado um anticorpo contra colágeno do tipo IV, um componente da membrana basal como já mencionado anteriormente. A utilização desses dois anticorpos apresentou sucesso em diferenciar vasos linfáticos de vasos sangüíneos¹⁴⁵.

2.6.4.3 Receptor endothelial de vaso linfático - LYVE-1

Em 1999, um grupo em Oxford mostrou que o LYVE-1 é uma proteína integral da membrana, homóloga do receptor de ácido hialurônico (CD44), envolvida no metabolismo tissular desse ácido, funcionando como um receptor. O ácido hialurônico facilita a migração celular, removendo a matriz pericelular dos fibroblastos e das células epiteliais, reduzindo o nível de adesão intercelular nos processos de cicatrização, inflamação e progressão tumoral¹²⁸.

O LYVE-1 está expresso também em células endoteliais sangüíneas apenas no início do período fetal¹⁴⁶, mas logo após o nascimento é encontrado especificamente em células epiteliais linfáticas, em macrófagos e nos capilares sinusóides hepáticos¹⁴⁷. Portanto sua expressão é específica

dos vasos linfáticos de adultos, com exceção aos capilares sinusóides hepáticos¹²⁶.

Na literatura indexada existem outros trabalhos que afirmam que o LYVE-1 está expresso em vasos linfáticos apenas de tecidos patológicos de tumor e de cicatrização e não está expresso nos vasos linfáticos normais¹⁴⁸. O estudo de *Kato S* e colaboradores corroborou esta hipótese, pois demonstrou não haver expressão de RNA mensageiro (RNAm) do LYVE-1 em vasos sangüíneos, além dos capilares sinusóides hepáticos, após o nascimento e confirmou que essa molécula está restrita às células endoteliais linfáticas¹²⁸.

Anteriormente a essa confirmação da especificidade do LYVE-1 em células epiteliais linfáticas, já havia sido demonstrada a associação do desenvolvimento intratumoral de vasos linfáticos, em carcinoma papilífero de tireóide bem diferenciado, e sua aparente associação com a disseminação de células tumorais para linfonodos¹⁴⁹. É também possível diferenciar vasos linfáticos de vasos sangüíneos utilizando o LYVE-1 e o marcador CD34, específico para vasos sangüíneos neoformados¹²⁸. Vários autores demonstraram a ocorrência de linfangiogênese intratumoral utilizando o LYVE-1 como marcador específico. Esses achados sugerem que o LYVE-1 é útil como marcador específico de vasos linfáticos em linfangiogênese patológica e fisiológica, transportando o ácido hialurônico através da parede do vaso linfático¹⁵⁰.

2.6.4.4 Família dos fatores de crescimento endotelial vascular

VEGF é composto uma família de citocinas que desempenha um papel fundamental na angiogênese e linfangiogênese.

A família dos fatores de crescimento endotelial vascular já apresenta cinco isotipos identificados, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e três receptores, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flt-1), VEGFR-3 (Flt-4).

Em 2002, Alitalo¹⁵¹ identificou que o VEGF-C é a citocina que age como um fator linfangiogênico e é expresso quase que exclusivamente nas células endoteliais^{152,153}. Desempenha função essencial no desenvolvimento de novos vasos linfáticos¹⁴. Na fisiologia tumoral, o VEGF-C está relacionado com o desenvolvimento da rede linfática intratumoral, à quimiotaxia da célula e à disseminação de células malignas pela via linfática¹⁴. Essa molécula vem sendo usada como marcador específico de epítomos do endotélio de vasos linfáticos.

O VEGF-C regula o desenvolvimento e crescimento desses vasos ligando-se ao seu receptor (VEGFR-3)¹⁵. O VEGFR-3 é expresso predominantemente na membrana citoplasmática da célula endotelial linfática em sua superfície interna, sinaliza o desenvolvimento crucial dos novos vasos linfáticos¹⁶. A expressão de VEGF-C é demonstrada em várias neoplasias humanas e sua hiperexpressão esta correlacionada com a metástase linfática, podendo ser usada como marcador prognóstico^{17,18}.

Algumas neoplasias já apresentam a correlação determinada entre VEGF-C, VEGFR-3, microdensidade de vasos linfáticos e prognóstico, como carcinoma epidermóide de orofaringe²¹, carcinoma de mama^{22,23}, carcinoma papilífero de tireóide²⁴, carcinoma de pulmão não de pequenas células²⁵, carcinoma coloretal²⁶ e carcinoma gástrico²⁷.

Destaca-se que em tumores carcinóides típicos de pulmão a correlação entre os marcadores de linfangiogênese (VEGF-C, VEGFR-3 e LYVE-1) não foi estudada e descrita na literatura indexada. Estabelecer essa correlação é de fundamental importância para melhor compreensão do desenvolvimento do processo de linfangiogênese e do aparecimento de metástase linfática. Isso pode ser utilizado em modelos de predição do risco individual de metástase com o intuito de se determinar qual a amplitude de ressecção cirúrgica para um determinado doente.

2.6.4.5 Podoplanina

Podoplanina é uma glicoproteína de superfície expressa em células osteoblásticas, pneumócitos tipo I e em podócitos renais. A especificidade da expressão da podoplanina no endotélio linfático e não vascular foi demonstrada na pele¹⁵⁴. Entretanto, a podoplanina parece estar presente apenas em pequenos vasos linfáticos e não nos vasos maiores que apresentam células musculares lisas¹⁵⁵. Até o momento, não existe evidência na literatura indexada que considere a podoplanina como marcador isolado e específico para a identificação do endotélio linfático.

2.6.4.6 Prox-1

“*Prospero-related Homeobox Gene-1*” (Prox-1), é um produto do gene homeobox. Sua presença se faz necessária para a formação de novos vasos linfáticos a partir de vasos embrionários pré-existent¹⁴⁶. A expressão do Prox-1 também foi encontrada em células não endoteliais do coração, fígado, pâncreas e sistema nervoso central¹⁵⁵.

Anticorpos contra epítomos da proteína Prox-1 humana foram utilizados para identificar endotélio dos vasos linfáticos em tecido tumoral em um número limitado de estudos^{156,157}. Apesar de sua localização nuclear ser ideal para quantificar vasos linfáticos, sua utilização só é válida se for pareada com outros marcadores, como o LYVE-1 ou a podoplanina.

2.7 Envolvimento linfático nos cânceres

Apesar de reconhecida a importância oncológica do envolvimento linfático, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que promovem a disseminação de células neoplásicas pelos vasos linfáticos para linfonodos sentinelas, linfonodos a distância e finalmente para outros órgãos por via hematogênica.

A disseminação de células neoplásicas é vista histologicamente como um escape tumoral e pode incluir a invasão de vasos linfáticos. Micrometástase para os linfonodos podem ocorrer mesmo antes do tumor

primário ser clinicamente detectável e normalmente é precursora de metástase em órgãos por via hematogênica. As metástases linfáticas são consideradas na maioria das neoplasias como um fator prognóstico significativo¹⁵⁸. O estadiamento linfático pode alterar o momento e o tipo de tratamento oferecido ao paciente. Desta forma, a investigação linfática é mandatória.

Biópsia de linfonodo sentinela é um método confiável para investigação do acometimento linfático. Esse método foi descrito inicialmente para pacientes portadores de melanoma¹⁵⁹ e atualmente é empregado em várias neoplasias^{160,161}. O método consiste no mapeamento pré-operatório da drenagem linfática do tumor primário, identificando o linfonodo através da injeção de um colóide marcado com radioisótopo e sua posterior identificação com um probe radionuclear ou através da injeção de azul de metileno^{162,163}. Essa técnica possibilita a identificação do linfonodo considerado como o de maior risco em conter células neoplásicas metastáticas^{124,159}.

Se a análise cito ou histopatológica desse linfonodo identificar células neoplásicas a remoção cirúrgica do restante da drenagem linfática anatomicamente correspondente àquela área é mandatória para o estadiamento e avaliação prognóstica^{124,159}.

A identificação de metástase linfática classifica o paciente em um grupo de maior risco de recorrência da doença. Assim, em algumas neoplasias, estes doentes se tornam elegíveis para tratamentos adjuvantes sistêmicos e locais, permitindo às vezes algum benefício em termos de

sobrevivência¹⁶¹. Em contrapartida os pacientes que apresentam linfonodos sentinela negativos para metástase são poupados de tratamentos mais agressivos, evitando assim as co-morbidades associadas a estes procedimentos. Esse conceito de linfonodo sentinela não se aplica aos carcinomas originários de certos sítios primários, onde a metástase linfática pode não seguir o trajeto preferencial de drenagem. O pulmão é um exemplo de órgão onde o acometimento linfático por células malignas ocorre de forma não seqüencial pelas cadeias de drenagem.

Entretanto a análise cito ou histopatológica tradicional, realizada com o método de coloração pela hematoxilina-eosina, pode não ser sensível para detectar todas as células neoplásicas presentes na estrutura, e por isso pode não ser suficiente para predizer o risco de recorrência. Em um terço dos pacientes com câncer de cólon em estágio inicial os métodos cito e histopatológicos de detecção de micrometástase são falso negativos segundo essa técnica de coloração^{161,164}. Esses pacientes, considerados inicialmente como não tendo linfonodos acometidos por células malignas, desenvolvem doença sistêmica ou recorrência local.

O mecanismo pelo qual as células neoplásicas migram para um determinado linfonodo permanece incerto. Acreditava-se que a invasão linfática ocorreria de maneira passiva. O tumor avançaria através da parede do vaso linfático que estaria em sua proximidade e a metástase ocorreria por drenagem passiva dessas células¹⁶⁵. Essa teoria baseava-se na alta permeabilidade dos vasos linfáticos e na ausência de membrana basal.

Entretanto, novas e fortes evidências indicam que uma interação bem mais complexa entre as moléculas constitucionais e funcionais das células tumorais e do endotélio linfático é necessária para o desenvolvimento de metástase linfática¹⁶⁶. A disponibilidade de novos marcadores linfáticos, como o LYVE-1, podoplanina e o Prox-1, aumentou a capacidade de identificação e quantificação de moléculas do endotélio de vasos linfáticos tumorais e peritumorais na maioria das neoplasias humanas.

Estudos imuno-histoquímicos, com marcadores específicos para vasos linfáticos demonstraram a existência de proliferação de vasos linfáticos intratumorais em várias neoplasias humanas. O significado funcional dessa descoberta ainda permanece incerto¹⁶⁷. Alguns estudos propõem que os vasos linfáticos intratumorais não são capazes de transportar células neoplásicas, pois a elevada pressão hidrostática intratumoral pode comprimir essas estruturas, não permitindo a drenagem das células^{167,168}. Entretanto, em outros estudos a densidade linfática intratumoral foi um fator preditivo de tempo livre de doença e de metástase em neoplasias como de mama, endométrio, cólon, pulmão, próstata, ovário pâncreas e cabeça e pescoço^{169,170,171,172,173,174,175,176}.

Vasos linfáticos peritumorais são os vasos que circundam o parênquima tumoral. A princípio, esses vasos foram considerados e classificados como vasos linfáticos pré-existentes, e não neoplásicos, da borda do tumor¹⁵⁵. Entretanto em vários estudos as células linfáticas endoteliais nesses linfáticos peritumorais estão em estado hipermetabólico e

em proliferação, sugerindo que esses vasos podem existir devido ao processo de linfangiogênese tumoral^{169,170,171,172}.

A linfangiogênese peritumoral também está associada à metástase linfática e a um menor tempo livre de doença e de sobrevivência em melanoma¹⁷⁷. A identificação de fatores de crescimento linfáticos também foi correlacionada com prognóstico em neoplasia de colo uterino, ovário, mama e trato gastrointestinal^{171,172,174,175,178,179,180,181}.

Apesar da discussão e das controvérsias sobre o papel específico de cada uma dessas populações de vasos linfáticos, peri e intratumorais, no desenvolvimento da disseminação neoplásica, há consenso de que exista relação entre a presença de qualquer uma dessas localizações de vasos linfáticos com metástase e evolução desses pacientes¹⁸².

2.8 Regulação molecular da linfangiogênese no câncer

Todos os membros da família do VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PDGF) apresentam um domínio homólogo (VHD), que contém 30% da mesma seqüência de aminoácidos e um nó principal de cisteína¹⁸³.

Apenas o VEGF-C e VEGF-D apresentam uma porção terminal N (N-pro) e outra porção terminal C (C-pro)^{183,184}. Essas porções sofrem clivagem proteolítica do VHD através da ação de enzimas como a plasmina¹⁸⁵ e a proproteína convertase^{184,186}. Esse processo produz a forma madura e bioativa do VEGF-C e do VEGF-D que consiste em dímeros do VHD, que apresentam alta afinidade pelo VEGFR-3^{184,187}.

VEGF-C é fundamental para a linfangiogênese embrionária e esses achados foram confirmados em modelos animais transgênicos e com deleção do VEGF-C^{183,188,189}.

A ligação do VEGF-C e do VEGF-D ao seu receptor VEGFR-3 ativa a transdução do sinal desse receptor. A ação desse receptor é através da fosforilação da via quinase PI-3 dependente da serina-treonina quinase (Akt) e da via dependente de p42/p44 (PKC) mitótica que por sua vez ativa a proteína quinase MAP (MAPK)^{188,190,191}. A ativação do VEGFR-3 não só protege as células endoteliais da apoptose como também estimula proliferação e migração dessas células¹⁹².

2.9 A via do VEGF-C/VEGFR-3

Dentro do conhecimento científico atual, o bloqueio da atividade do VEGFR-3 parece ser o alvo de preferência. Conceitualmente existem várias maneiras de bloquear a linfangiogênese induzida pelo tumor dependente de VEGFR-3. Anticorpos que bloqueiam a atividade de seus ligantes, o VEGF-C e o VEGF-D, já foram produzidos. Estes anticorpos se acoplam aos ligantes, não permitindo que os mesmos se liguem com seu receptor, VEGFR-3^{193,194}.

Outra maneira de bloquear essa via é através do bloqueio do próprio receptor. O anticorpo contra o VEGFR-3 se liga a este receptor, demonstrando afinidade. Entretanto, não é constatada atividade, uma vez

que o anticorpo ocupa o sítio que seria utilizado por seus ligantes, não permitindo a interação do VEGF-C e do VEGF-D^{195,196}.

Proteínas solúveis que mimetizam o domínio extracelular de ligação do VEGFR-3 se mostram efetivas para o seqüestro de seus ligantes VEGF-C e VEGF-D, impedindo que esses se liguem ao VEGFR-3^{197,198,199}.

Moléculas inibitórias com baixo peso molecular que bloqueiam a via de sinalização intracelular do domínio citoplasmático VEGFR-3, que inibem a atividade da quinase desse receptor já foram produzidas^{200,201,202,203}. Qualquer uma dessas abordagens pode apresentar sucesso na prática terapêutica.

2.9.1 Outros fatores indutores de linfangiogênese

É necessária a discussão de alguns pontos em relação à utilização de terapias alvo direcionadas para linfangiogênese induzida pelo tumor.

Até o momento a via do VEGFR-3 é a mais conhecida e, portanto, é a via de maior interesse terapêutico. Ela deve exercer papel fundamental para a eficácia do tratamento. Entretanto, é sabido que existem outras moléculas capazes de induzir linfangiogênese. Por exemplo, em ensaios com córnea, o fator de crescimento FGF-2 foi capaz de induzir linfangiogênese indiretamente aumentando a expressão de VEGF-C^{204,205}. O fator PDGF parece estimular linfangiogênese diretamente²⁰⁶, pois apresenta o Tie-2 ligado ao Ang-1²⁰⁷ e o fator de crescimento de hepatócito, o ligante c-Met²⁰⁸. A família do VEGF-A pode também apresentar atividade linfangiogênica

direta. É sabido que os fatores VEGF-C e VEGF-D induzem a ativação de uma proteína da superfície da membrana celular ($\alpha 9\beta 1$), que está envolvida no desenvolvimento e na função dos vasos linfáticos²⁰⁹. O significado da ação dessa proteína no processo de linfangiogênese induzida pelo tumor ainda precisa ser determinado e estudado.

2.9.2 A via do VEGF-C é reversível?

O aumento da expressão do VEGF-C e do VEGF-D e sua correlação com metástases para os linfonodos regionais e com pior prognóstico já foi determinado em várias neoplasias.

O aumento dessa expressão parece ocorrer em estágios precoces da doença, portanto é necessário saber se a linfangiogênese induzida pelo tumor pode ser reversível ou não.

Se a permanência dos vasos linfáticos já induzidos pelo tumor depende do estímulo contínuo dos fatores VEGF-C e VEGF-D, como os vasos sangüíneos dependem de fatores pró-angiogênicos, o bloqueio da atividade do VEGFR-3 deve resultar em regressão dos linfáticos já induzidos pelo tumor. Porém, se a linfangiogênese já induzida pelo tumor não for reversível, tentativas de bloquear essa via não serão eficientes para diminuir a extensão do leito linfático neoformado já estabelecido.

Atualmente ainda não sabemos o que regula a estabilidade dos vasos linfáticos. Durante o processo de reparação tecidual a linfangiogênese parece regredir²¹⁰ e experimentalmente isso também é possível¹⁸⁸.

Entretanto, em alguns contextos experimentais ou patológicos a linfangiogênese parece ser um evento bem estável. Em experimentos com córnea a linfangiogênese induzida pelo FGF-2 parece permanecer estável por meses mesmo sem o estímulo presente²⁰⁵. A linfangiogênese induzida pela infecção por *Mycoplasma pulmonis* permanece estável mesmo após o tratamento dessa infecção²¹¹.

2.9.3 Linfangiogênese e metástase hematogênica

No paciente com câncer o aparecimento de metástase hematogênica em órgãos vitais é o fator determinante para o comprometimento das funções destes e conseqüentemente da vida desses pacientes. Portanto, a inibição da linfangiogênese tumoral por mecanismo terapêutico torna-se fundamental se realmente for comprovado o mecanismo de disseminação de células neoplásicas para a circulação sangüínea através da via linfática (linfonodos e posteriormente ducto torácico).

Há décadas especialistas tentam determinar qual é a importância da disseminação linfática para o aparecimento de metástase em órgãos por via hematogênica. A importância do status linfático para o prognóstico do paciente com câncer pode ser uma indicação indireta que a metástase linfática tem papel importante na disseminação de células neoplásicas para a circulação sangüínea e, dessa forma, para outros órgãos.

Entretanto, este evento pode significar apenas que as células neoplásicas adquiriram concomitantemente competência metastática tanto

linfática quanto sanguínea. Nos pacientes com câncer é difícil determinar o papel da metástase linfática na disseminação para órgãos por via hematogênica. Os poucos estudos referentes ao tema não têm por objetivo estabelecer relação causal entre os fenômenos e descrevem apenas concomitância dos dois fenômenos. Dessa forma, mesmo aqueles que sugerem relação causal como conclusão apresentam fracas evidências que corroborem essa interpretação. Além disso, esses estudos foram realizados em uma época em que pouco se sabia sobre marcadores linfáticos.

Os estudos com animais representam um modelo que permite melhor controle de covariáveis para avaliação da importância das metástases linfáticas. Em estudos com animais a indução da linfangiogênese não só aumentou o acometimento dos linfonodos como também promoveu metástases para os pulmões^{199,212}. Corroborando essa hipótese, em outros estudos controlados com modelos animais em que foram empregadas técnicas para supressão da linfangiogênese induzida por tumor, não só o aparecimento de metástase linfática como também metástase pulmonar foram menores¹⁹⁹. Entretanto, em outros estudos, também em modelos animais, a supressão da linfangiogênese induzida pelo tumor foi capaz de reduzir o aparecimento de metástase para os linfonodos, mas não para os pulmões¹⁶⁷.

Em alguns estudos foi verificado que quando as células tumorais adquirem competência metastática ocorre disseminação tanto para a circulação sanguínea como para a linfática. Entretanto, devido à alta taxa de destruição das células neoplásicas na circulação sanguínea, bem como a

outros fatores como o stress hemodinâmico e a imunovigilância, o número de células sobreviventes na corrente sanguínea não seria suficiente para o desenvolvimento de metástases em órgãos por via hematogênica.

Como a disseminação para a circulação linfática é mais fácil, o aparecimento de metástase linfática é mais freqüente que a hematogênica na maioria dos tipos histológicos de carcinomas. O estabelecimento e crescimento das colônias de células metastáticas linfáticas aumentam a população de células com potencial metastático que podem alcançar órgãos por via hematogênica através do ducto torácico¹. A controvérsia existe e novos estudos elucidativos são necessários para responder essa questão.

2.10 Terapias antilinfangiogênicas em câncer

A partir do conhecimento de marcadores específicos para linfangiogênese foi possível identificar sítios potenciais para o desenvolvimento de drogas antilinfangiogênicas.

Provavelmente, a terapia antilinfangiogênese não deverá afetar o crescimento de metástases pré-existentes estabelecidas em tecidos linfóides ou de órgãos atingidos por via hematogênica, mas poderá inibir a linfangiogênese induzida continuamente pelo tumor. Isso pode reduzir o aparecimento de novas metástases após o diagnóstico e tratamento inicial do tumor primário. Ou seja, o desenvolvimento desses novos componentes

do arsenal terapêutico poderá contribuir para o tratamento sistêmico das neoplasias.

A supressão profilática de metástases pode ser benéfica para os pacientes com tumores já tratados e em remissão, mas com grande risco de recorrência; ou para aqueles que a abordagem de tratamento incluía apenas terapia de suporte e observação (“*wait and watch*”).

Pacientes com neoplasias indolentes, de crescimento lento, podem se beneficiar dessa abordagem terapêutica. Pacientes com neoplasia de próstata em estágio inicial, atualmente não são candidatos a nenhuma modalidade de tratamento cirúrgico ou radioterápico e permanecem apenas em observação. Os riscos do tratamento superam o seu benefício e normalmente o tumor é deixado *in situ*. Entretanto, 16 a 25% dos pacientes evoluirão com progressão e eventualmente com metástases no período de 8 a 10 anos²¹³. A administração crônica de agentes que suprimam o desenvolvimento de metástases linfáticas pode modificar a história natural dessa doença e alterar a sobrevivência desse grupo de pacientes.

2.10.1 Possíveis efeitos do bloqueio da linfangiogênese e fisiológica

Determinar se a terapia antilinfangiogênica pode afetar processos fisiológicos, levando o indivíduo a apresentar efeitos colaterais indesejados se faz necessário.

Até o momento, sabe-se que a inibição prolongada da linfangiogênese afeta os novos vasos linfáticos no processo de cicatrização e de reparação tecidual²¹⁰. Essa inibição pode resultar em edema no tecido regenerado. Entretanto, esse efeito colateral ainda não foi investigado propriamente.

A inibição da linfangiogênese através da via do VEGFR-3 pode afetar outras células além das linfáticas. Em alguns estudos com animais transgênicos com ausência ou bloqueio do gene do VEGF-C (“*Knock-out*”) o bloqueio dessa via alterou a hematopoiese, trazendo conseqüências hematológicas. Em embriões de rato com deficiência de VEGFR-3 houve redução de 50% do número das células hematopoiéticas no sangue periférico, embora não tenha havido redução das células-tronco²¹⁴. No adulto, o VEGFR-3 está expresso nos monócitos periféricos CD14 positivos^{215,216}, nos macrófagos associados ao tumor localizados no citoplasma²¹⁵, na córnea, em megacariócitos, em células neuronais (neurópilos da medula espinhal em células neuronais da retina e em outras células não vascularizadas do córtex cerebral)^{217, 218,219}.

2.10.2 Drogas antilinfangiogênicas

2.10.2.1 Drogas em estudo clínico

AZD2171 é um potente inibidor da atividade da tirosina quinase do VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Portanto, sua ação inibe tanto

angiogênese como linfangiogênese. Essa droga de formulação oral, está em estudo de fase III, com doentes com tumores sólidos em vários sítios (mama, cólon, rim, pulmão, GIST, entre outros).

PTK 787/ZK 222584 também é um inibidor da atividade da tirosina quinase, mas sua ação sobre o VEGFR-3 só acontece em concentrações muito altas dessa droga.

2.10.2.2 Drogas em uso na prática clínica

Sorafenibe (Nexxavar), é uma droga inibidora da Raf quinase, desenvolvida para esse alvo. Raf é uma parte da via do oncogene Ras. Ras é um gene que direciona a células para a divisão celular e está superexpresso em várias neoplasias. Em adição a esse alvo, o sorafenibe inibe VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR. Acredita-se que sua atividade antitumoral se deva mais à inibição dos receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR) do que da Raf quinase. Essa droga já é utilizada em tumores renais²²⁰.

O Sunitinibe (nome comercial Sutent) é uma molécula oral pequena, inibidora de múltiplos receptores de tirosina quinase.

O sunitinibe inibe múltiplas tirosina-quinases ligadas ao receptor (TKRs) que implicam no crescimento tumoral, na angiogênese patológica e na progressão metastática do câncer. O sunitinibe foi identificado como um inibidor dos receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α e PDGFR β), dos receptores do fator de crescimento vascular

endotelial (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), do receptor do fator de células-tronco (KIT), da tirosina quinase-3 similar a Fms (FLT3), do receptor do fator de estimulação de colônias Tipo 1 (CSF-1R) e do receptor do fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (RET)²²¹.

2.10.2.3 Drogas antilinfangiogênicas em carcinóides

Até o presente momento não existem estudos clínicos com drogas com potencial antilinfangiogênicos em tumores carcinóides de qualquer sítio primário.

3 OBJETIVOS

- 3.1 Identificar o padrão de imunexpressão do LYVE-1, VEGF-C, VEGFR-3 em tumores carcinóides típicos broncopulmonares.

- 3.2 Verificar se há diferença na imunexpressão dos três imunomarcadores entre os grupos de pacientes com e sem metástase (linfática ou hematogênica).

- 3.3 Verificar se é possível prever o risco individual de metástase linfática e hematogênica em função da expressão dos imunomarcadores e de variáveis clínicas anatomopatológicas.

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Parecer da Comissão de Ética

O projeto do presente estudo (Protocolo de Pesquisa número 277/04) 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 29/04/2004.

4.2 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo em uma população composta por todos os doentes operados de tumor carcinóide típico broncopulmonar nos Serviços de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardiopneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no “*Hôpital Européen Georges Pompidou*” da Universidade Paris V, Paris, França, seguidos por mais de cinco anos ou que apresentaram metástase linfática ou hematogênica confirmadas histologicamente independente do período de acompanhamento pós-operatório.

Foi também realizado um estudo adicional com desenho caso-controle para comparar parâmetros entre os grupos com e sem metástases.

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- 1) a confirmação do diagnóstico histológico de tumor carcinóide típico broncopulmonar pela análise do tumor primário por dois patologistas de reconhecida experiência no assunto;
- 2) disponibilidade de dados referentes ao estadiamento TNM;
- 3) acompanhamento maior que cinco anos completos e exame de tomografia computadorizada de tórax ao final desse período.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos:

- 1) os indivíduos cujo diagnóstico foi de tumor carcinóide atípico ou carcinoma neuroendócrino de grandes células segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2004²³.
- 2) os portadores das Síndromes de Neoplasias Endócrinas Múltiplas.

4.3 Casuística

Todos os 182 pacientes operados para tratamento de tumores carcinóides típicos broncopulmonares, nos dois hospitais que compõe o estudo e seguidos por mais de cinco anos, foram incluídos de forma consecutiva no estudo.

A data do início e do final das inclusões varia para cada hospital. Do Serviço de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardiopneumologia do HCFMUSP foram incluídos 72 pacientes operados no período de 1981 a

2001 e do “*Hôpital Européen Georges Pompidou*” da Universidade Paris V, Paris, França, foram incluídos 110 pacientes operados no período de 1984 a 2001.

4.3.1 Descrição da casuística (Apêndice 1)

4.3.1.1 Gênero

A casuística foi composta por 75 homens (41,2%) e 107 mulheres (58,8%).

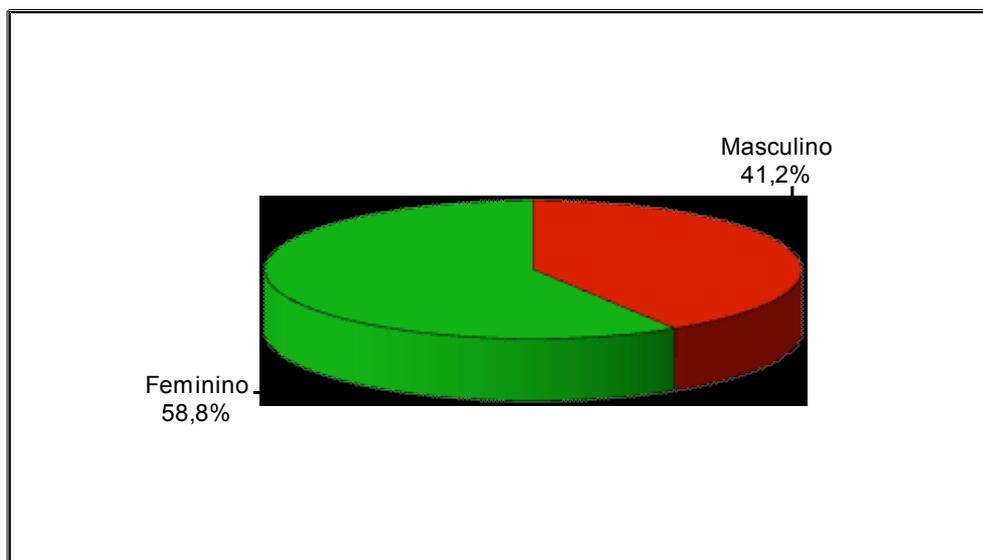


Gráfico 1 – Distribuição por gênero

4.3.1.2 Localização do tumor em relação à carina

Em relação à carina, a localização do tumor mais freqüente foi a central.

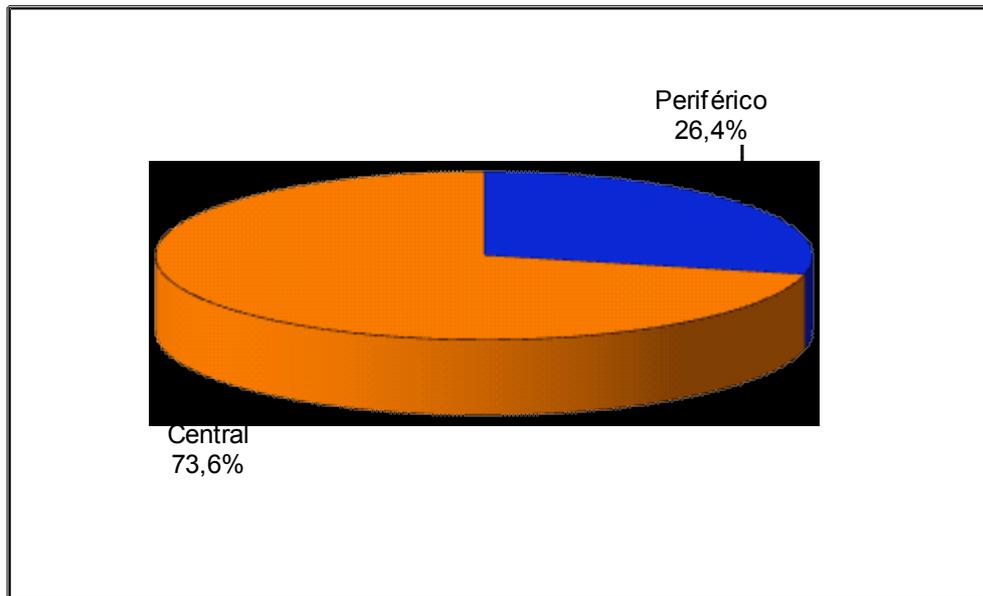


Gráfico 2 – Localização do tumor em relação à carina

4.3.1.3 Comprometimento da margem de ressecção do tumor

A margem comprometida por tumor (positiva) representou 7,7% dos pacientes.

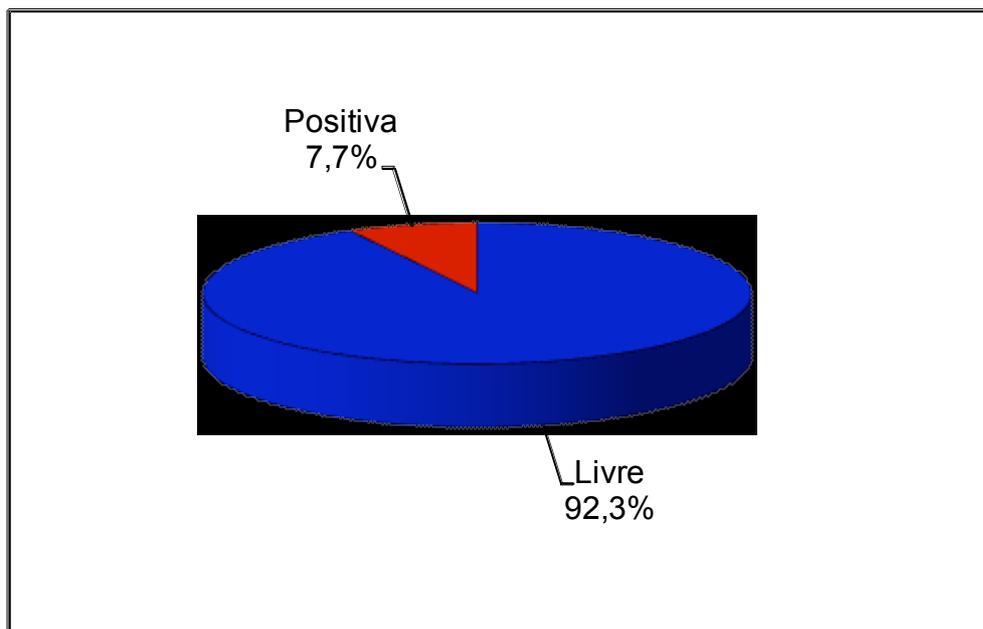


Gráfico 3 – Comprometimento da margem de ressecção do tumor

4.3.1.4 Estádio T

Os estádios iniciais T1 e T2 totalizam 91,8% dos pacientes da casuística.

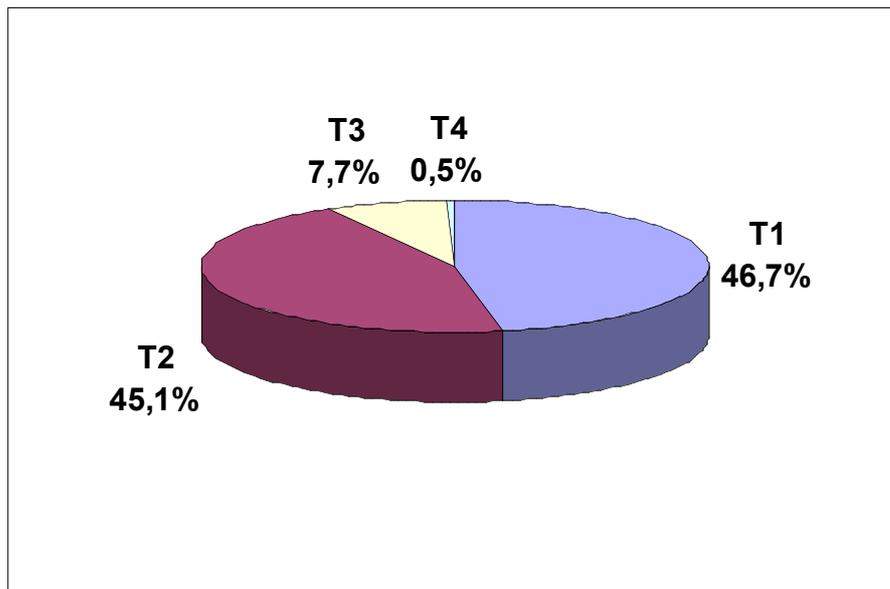


Gráfico 4 – Estádio T

4.3.1.5 Linfonodos positivos

Aproximadamente um sexto dos pacientes da casuística apresentou comprometimento linfático, linfonodos positivos para células neoplásicas.

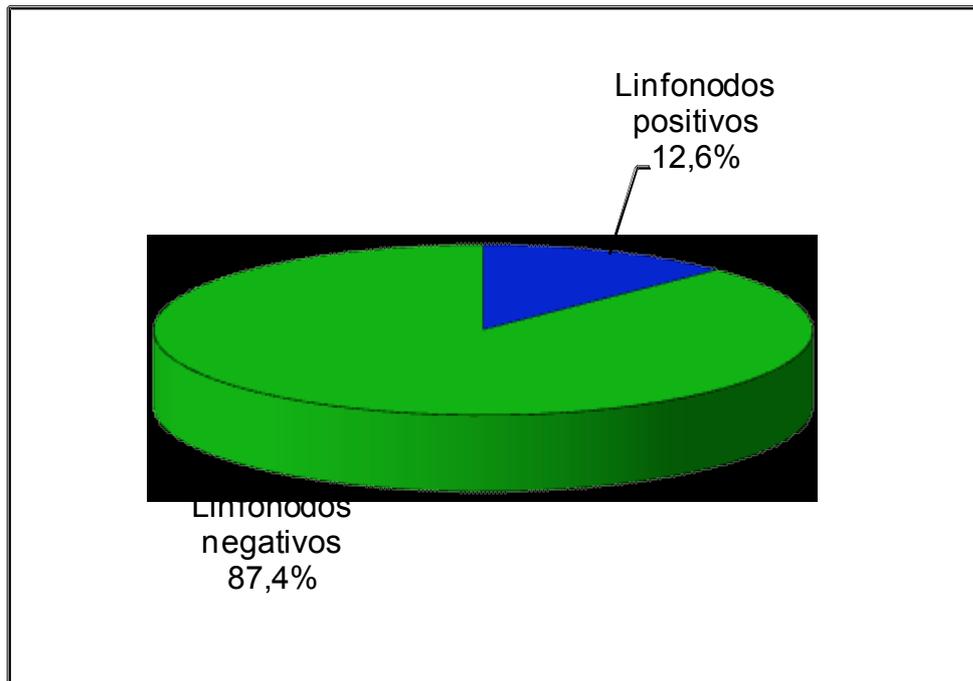


Gráfico 5 – Comprometimento dos linfonodos por neoplasia

4.3.1.6 Metástase hematogênica

Metástase hematogênica foi identificada em 14 pacientes da casuística.

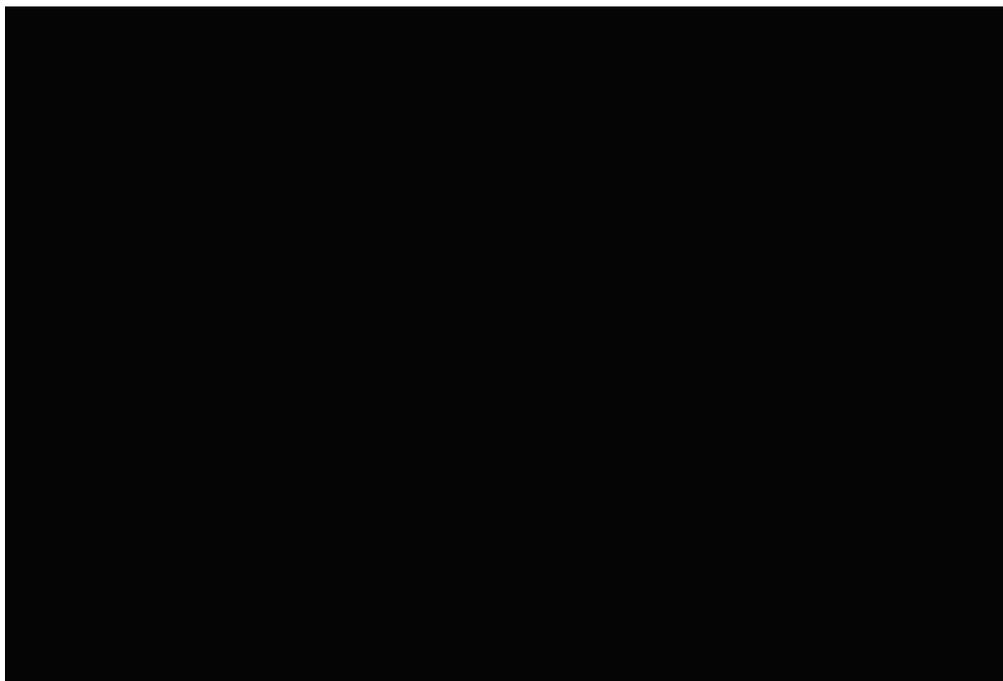


Gráfico 6 – Presença de Metástase hematogênica

4.4 Método

4.4.1 Confirmação do diagnóstico histológico

Foram revisados todos os espécimes histológicos de tumores primários, dos linfonodos e metástases ressecadas.

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

Cortes histológicos de 3 µm de cada bloco representativo do tumor primário foram montados sobre lâminas e corados por hematoxilina-eosina. Estas foram revistas separadamente e de forma aleatória por dois patologistas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com expressiva experiência na análise de carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares. Os casos nos quais o diagnóstico foi de proliferação neuroendócrina bem diferenciada com diâmetro inferior a 5 mm ("*tumorlets*"), tumor carcinóide atípico, carcinoma neuroendócrino de grandes ou pequenas células, de células claras e outros carcinomas com áreas de diferenciação neuroendócrina foram excluídos do estudo. Nenhum dos patologistas conhecia o diagnóstico prévio referente aos tumores analisados.

Foram apenas incluídos os casos nos quais houve, obrigatoriamente, concordância no diagnóstico de tumor carcinóide típico pelos dois patologistas.

A classificação do tipo de tumor neuroendócrino foi realizada nas áreas mais representativas, identificadas após análise de pelo menos 10 campos microscópicos a uma ampliação de 250 vezes. Já a classificação histológica obedeceu aos critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde²⁵, baseado no padrão predominante identificado, cujos critérios são apresentados a seguir.

Tabela 1 - Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos²³

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

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

Após essa seleção, as lâminas obtidas a partir dos blocos referentes aos 182 pacientes recrutados, foram preparadas para a marcação imuno-histoquímica para, LYVE-1, VEGF-C e VEGFR-3.

4.4.2 Revisão dos prontuários

Inicialmente, foi realizada revisão dos prontuários dos pacientes com diagnóstico confirmado de tumor carcinóide típico broncopulmonar.

Os dados coletados foram: gênero, idade no momento do ato operatório, localização do tumor em relação à carina (central ou periférico), diâmetro da lesão, comprometimento da margem cirúrgica, estadiamento TNM segundo a UICC²²², ocorrência de metástases linfáticas, bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia, metástases hematogênicas e sobrevivência ou ocorrência de óbito relacionado. Óbito não relacionado foi considerado como final do tempo de acompanhamento pós-operatório.

A obtenção dos dados de acompanhamento que eventualmente não constavam nos prontuários disponíveis foi completada por meio da convocação dos pacientes, comunicação pessoal, visitas domiciliares e/ou questionários enviados aos familiares enfocando dados relacionados à recidiva, metástase e causa de óbito.

4.4.3 Interpretação do TNM

O *status* “T”: foi obtido através da interpretação de dados do laudo anatomopatológico, descrição cirúrgica, laudo de exames de imagem e broncoscópicos pré-operatórios.

O *status* “N”: a verificação do estadiamento linfático inicial foi obtida pela revisão histológica dos linfonodos ressecados no momento da operação da lesão principal.

Para o estadiamento linfático final, foi considerada a imagem da região hilar e mediastinal após cinco anos completos de acompanhamento pós-operatório, obtida por tomografia computadorizada e/ou octreoscan.

O *status* “M”: foi considerado dado satisfatório para a determinação da presença de metástase hematogênica, a confirmação histológica do diagnóstico de carcinoma neuroendócrino na lesão metastática ou a positividade ao exame de radiodiagnóstico com análogo de somatostatina marcada.

Foi considerada a não-ocorrência de metástase hematogênica a descrição em prontuário, realizada por cirurgião torácico ou oncologista, de: ausência de sinais, de sintomas, assim como ausência de suspeita de lesão metastática em método diagnóstico de imagem obtido após um período de acompanhamento pós-operatório superior a cinco anos.

4.4.4 Técnica de imuno-histoquímica utilizada para detecção do antígeno LYVE-1, VEGF-C e VEGFR-3

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

Estas foram submetidas ao processo de silanização: mergulhadas em cubas com álcool, acetona, silane (SIGMA A3648 - Diagnostics, St. Louis, USA) e água destilada.

A técnica de imuno-histoquímica aplicada seguiu o seguinte protocolo¹⁰⁴ : as lâminas foram desparafinadas (permaneceram 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de banhos de xilol). Em seguida, o tecido foi hidratado por submersão em álcool absoluto, 95% e 70%, lavado em água, água destilada e deionizada. O próximo passo foi a recuperação antigênica realizada em panela a vapor com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 a 95-100°C. Após 35 minutos, as lâminas foram lavadas em Tampão Fosfato de Sódio (PBS) 0,05 M, pH 7,2-7,4. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%), seguido de lavagem em água, em água destilada e em PBS. Seguiu-se então com o bloqueio de sítios inespecíficos colocando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos.

Diluíram-se então os seguintes anticorpos primários (cada um em um recipiente distinto) em Soro Albumina Bovina (BSA): LYVE-1 (1:20; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000), VEGF-C (1:20; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) e VEGFR-3 (1:20; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000). Todas as lâminas foram cobertas com 100 µL dessas

soluções e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário LSAB-HRP (*Large Streptavidin-Avidin-Biotin – System Peroxidase*; k-0690; Dako A/S, Copenhagen, Denmark): 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 banhos 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), lavadas em água, contracoradas em hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente para serem desidratadas em álcool 70%, 95%, absoluto e em solução de xilol, respectivamente. As lâminas foram finalmente montadas com lamínula e Entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Para controle externo positivo, foi corado simultaneamente às reações descritas num fragmento de tecido indicado pela bula fornecida pelo fabricante, língua para o LYVE-1 e linfonodo para o VEGF-C e VEGFR-3. Para controle interno positivo foi utilizada a marcação dos macrófagos nas próprias lâminas estudadas na casuística. Para controle negativo, os mesmos cortes foram incubados com BSA, sem adição de anticorpo.

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas nos 110 casos provenientes da França. A quantidade de anticorpo não seria suficiente para corar as 182 lâminas de toda a casuística.

4.4.5 Determinação dos índices imuno-histoquímicos

Para determinar os índices proliferativos depois da imuno-histoquímica foi usada a técnica do *point-counting*, com auxílio de retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas, segundo proposto em 1988 por Gundersen e colaboradores²²³. Ao aumento de 400x, foram examinados dez campos microscópicos aleatórios e não-coincidentes, totalizando 1.000 pontos por lâmina, cobrindo uma área de 62.500 μm^2 na área de tecido tumoral.

A coloração castanha evidenciou a expressão dos antígenos LYVE-1, VEGF-C e VEGFR-3 nas células marcadas.

Para corrigir os dados, tendo em vista as diferenças de expansão dos tecidos das biópsias estudadas, fator que não foi controlado durante a feitura das mesmas, não foram considerados os pontos que não incidiam sobre as células tumorais.

O índice imuno-histoquímico (IPI) foi obtido pela seguinte relação:

$$\text{IPI} = \frac{P_i}{P_{\text{tumor}}} \times 1000$$

Na qual, P_i representa a somatória dos pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico (vasos linfáticos para o LYVE-

1 e células tumorais para o VEGF-C e VEGFR-3) nos dez campos estudados e P_{tumor} é a somatória do total de pontos que incidem sobre células tumorais.

Comparações da contagem de dois observadores foram feitas em aproximadamente 20% dos casos em cada marcador imuno-histoquímico. O coeficiente de erro entre os dois observadores foi menor a 5%.

4.5 Análise estatística

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

4.5.1 Estatística descritiva

As variáveis estudadas foram descritas por uma medida de tendência central e por uma medida de dispersão.

Essas medidas foram escolhidas com base no padrão de distribuição de frequência de valores obtidos: paramétrico ou não paramétrico, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnoff.

Para amostras de dados de variáveis contínuas com padrão paramétrico foram utilizados: média como medida de tendência central, desvio-padrão e erro padrão da média com intervalo de confiança a 95% como medida de dispersão.

Para amostras de dados de variáveis contínuas com padrão não-paramétrico foram utilizadas: mediana como medida de tendência central e intervalos inter-quartis como medida de dispersão.

As amostras de dados de variáveis categóricas ou binárias foram descritas pelas frequências absolutas.

4.5.1.1 Casuísta como caso-controle (com ou sem metástase)

Para a comparação entre os grupos caso-controle (com e sem metástase), para amostras de dados de distribuição paramétrica utilizou-se a comparação de médias pelo teste t de Student.

Para a comparação entre os grupos caso-controle, para amostras de dados de distribuição não-paramétricas utilizou-se o teste de medianas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para a comparação de frequências utilizou-se o teste exato de Fischer.

4.5.2 Análise multivariada de predição de risco

O modelo matemático utilizado para a verificação da possibilidade de predição do risco individual tanto de metástase hematogênica quanto linfática foi o de regressão logística.

A variável independente a ser predita é metástase. Foram realizadas análises em separado para metástase linfática e hematogênica.

Para a análise da fase exploratória, foram utilizadas todas as variáveis independentes que foram identificadas na análise univariada como candidatas a preditivas, com probabilidade de erro do tipo I de 10%. Essas variáveis foram introduzidas na equação logística segundo o método condicional em degraus com ordem de entrada escolhida pelo pesquisador (*“conditional enter”*).

As variáveis independentes cujo modelo identificou como preditivas do evento binário dependente, com probabilidade de erro do tipo I de 5% foram selecionadas para a equação final. O critério de escolha do modelo foi o último degrau da análise condicional e não critério de informação Bayesiano ou de Akaike.

A magnitude da influência da variável independente na predição do evento binário dependente foi descrita pelo valor do exponencial neperiano de beta, que se aproxima do valor da razão de riscos.

5 RESULTADOS

5.1 Imunomarcção dos anticorpos

Pela primeira vez no Brasil foi realizada a titulação do anticorpo LYVE-1. Nenhum laboratório de anatomia patológica no Brasil havia utilizado esse marcador.

Foram testadas as titulações (1:50; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000) dos anticorpos LYVE-1, VEGF-C e VEGFR-3 para identificar a melhor marcação das proteínas estudadas.

Para o LYVE-1 verificamos controle interno negativo, sendo possível a quantificação dos vasos linfáticos marcados por esse anticorpo. Entretanto, para o VEGF-C e VEGFR-3 não identificamos controle interno negativo. A ausência de controle interno negativo impossibilitou a quantificação das células tumorais que foram imunomarcadas com esses anticorpos.

A reação imuno-histoquímica foi realizada nos 110 casos da Franca. Nove casos precisaram ser excluídos por problemas técnicos no processamento dos reagentes. Todos os casos excluídos eram de pacientes que não apresentaram metástase linfática ou hematogênica.

5.1.1 LYVE-1

A titulação utilizada foi 1:500 para o LYVE-1.

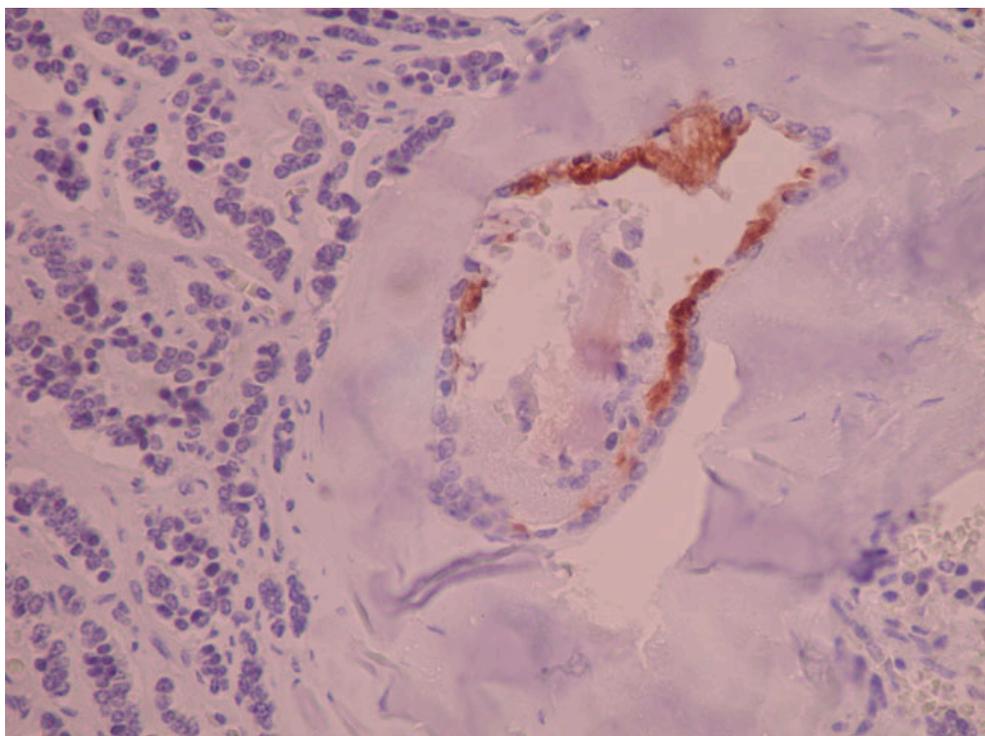


Figura 1: Carcinóide típico LYVE-1(B941347T) (X200)

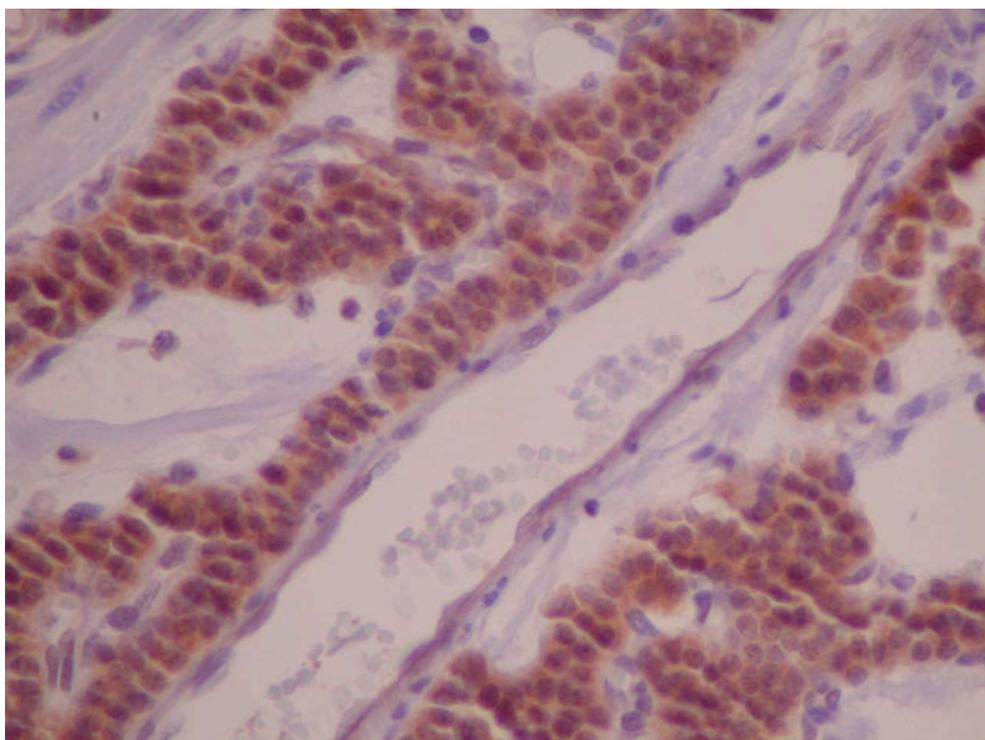


Figura 2: Carcinóide típico LYVE-1 (A12331) (X400)

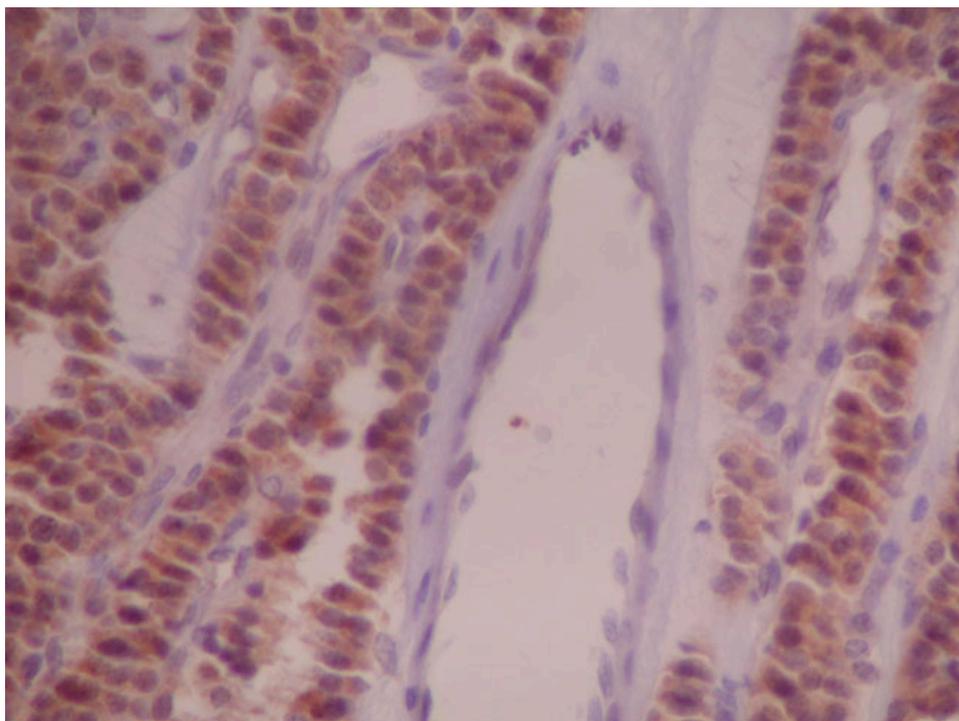


Figura 3: Carcinóide típico LYVE-1 (A12331) (X400)

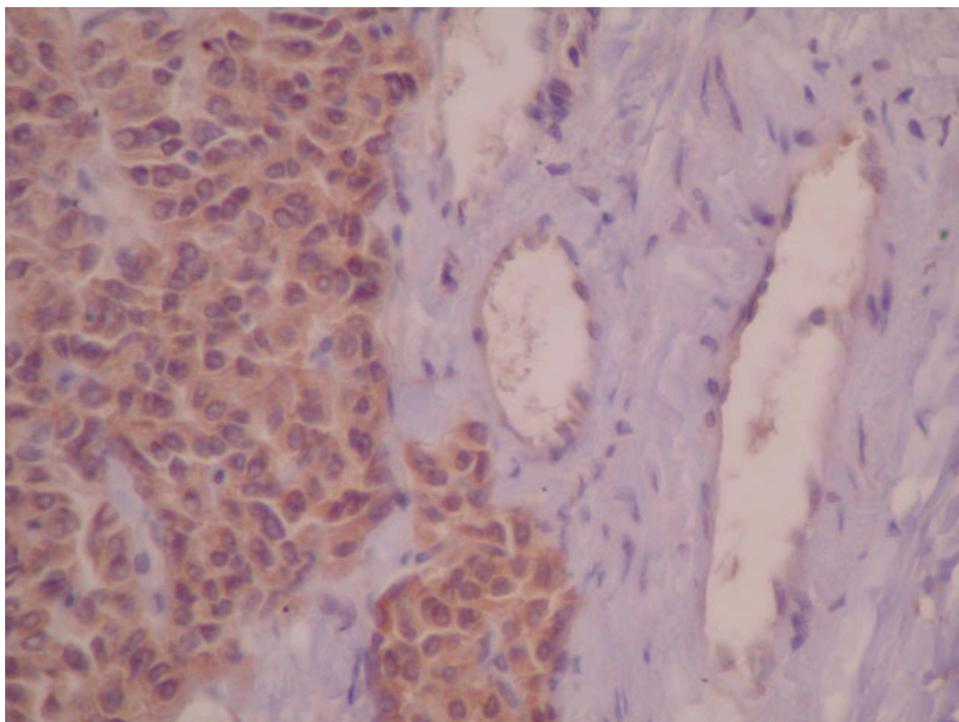


Figura 4: Carcinóide típico LYVE-1 (966096) (X400)

5.1.2 VEGF-C

As titulação utilizada foi 1:2000 para o VEGF-C.

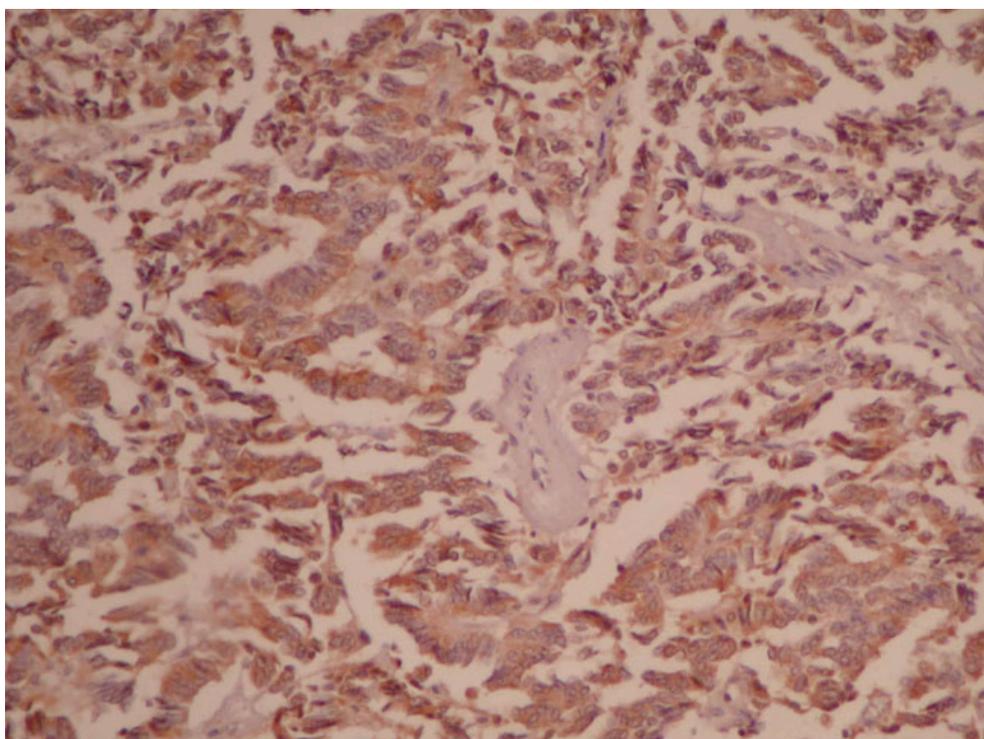


Figura 5: Carcinóide típico VEGF-C (B941347T) (X400)

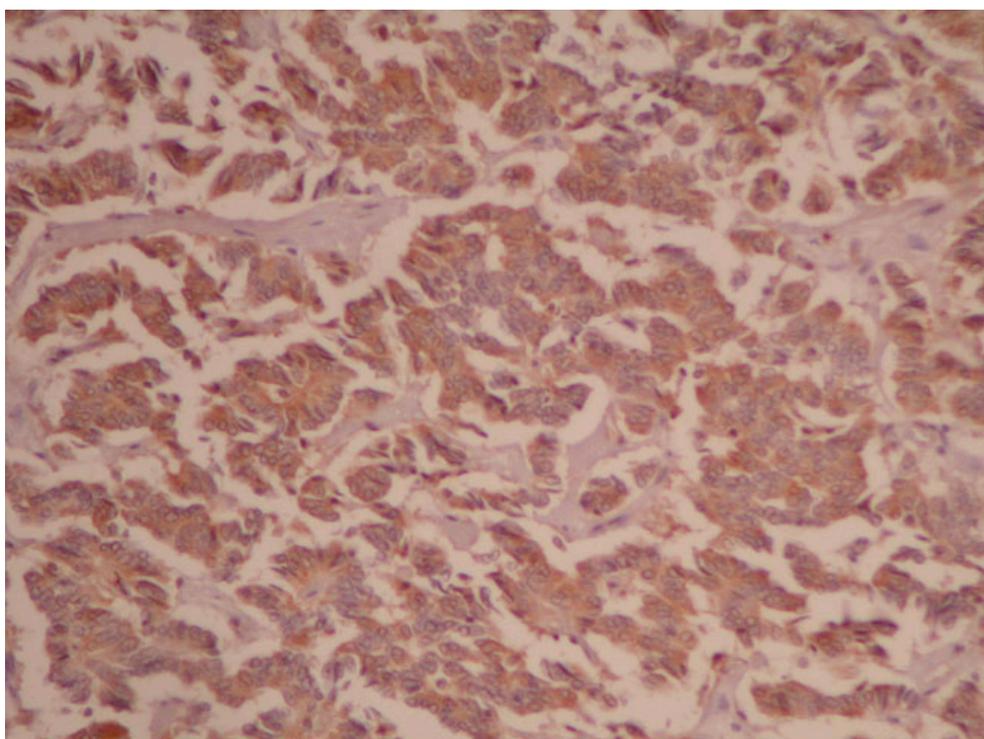


Figura 6: Carcinóide típico VEGF-C (922619) (X400)

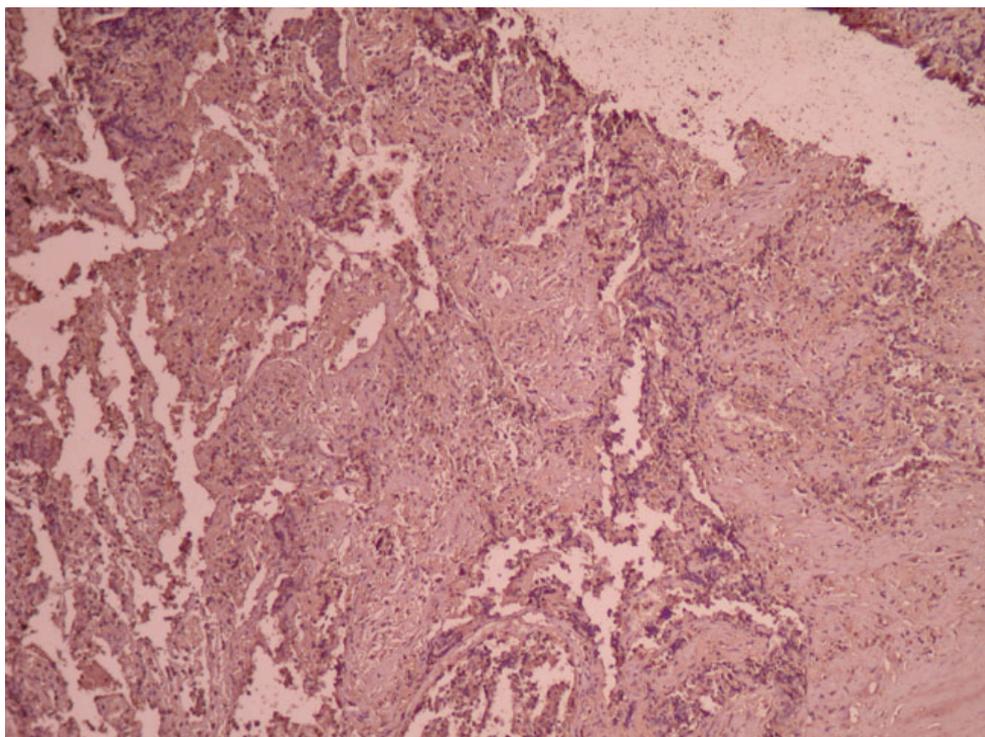


Figura 7: Carcinóide típico VEGF-C (HC4209710B) (X200)

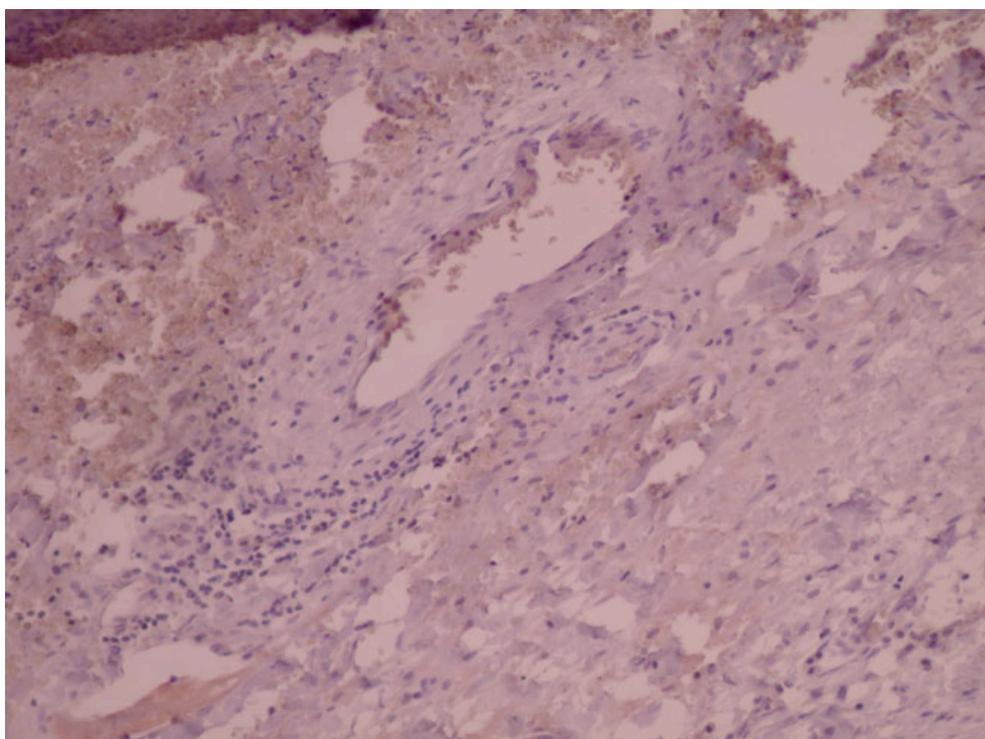


Figura 8: Carcinóide típico VEGF-C (963131) (X400)

5.1.3 VEGFR-3

As titulação utilizada foi 1:2000 para o VEGFR-3.

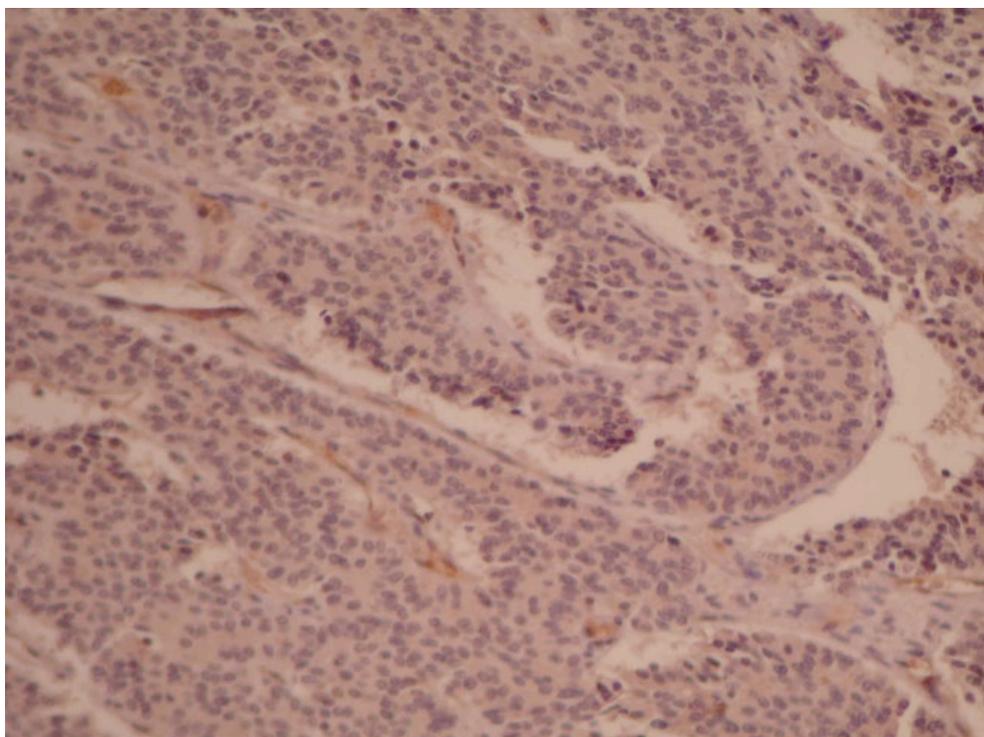


Figura 9: Carcinóide típico VEGFR-3(994209) (X200)

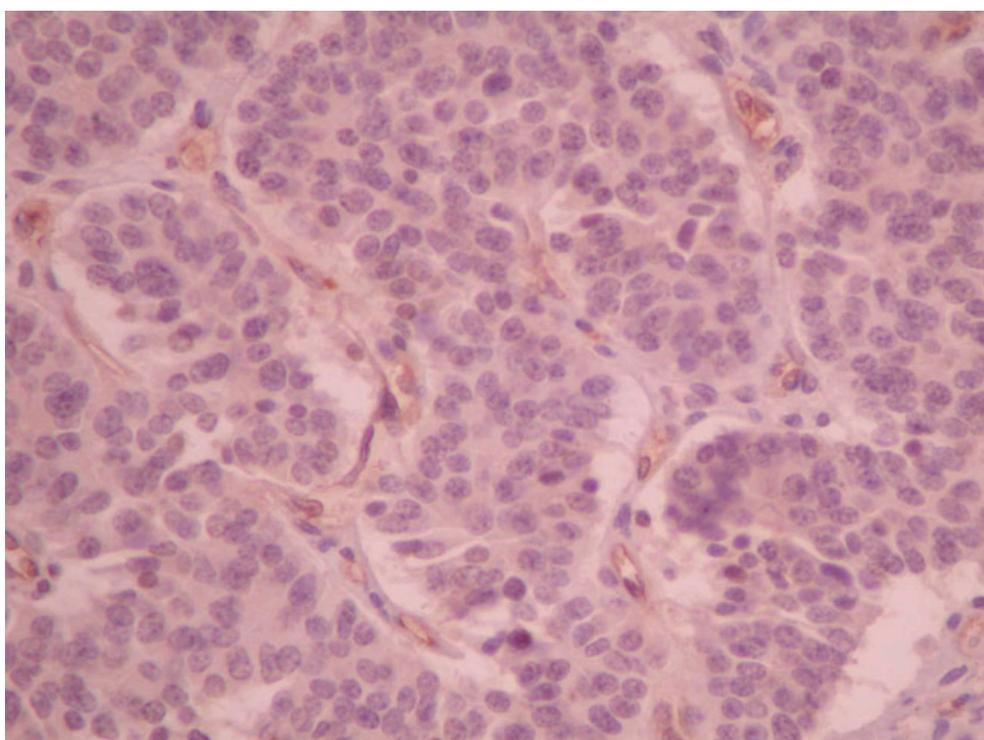


Figura 10: Carcinóide típico VEGFR-3 (HC4209710B) (X400)

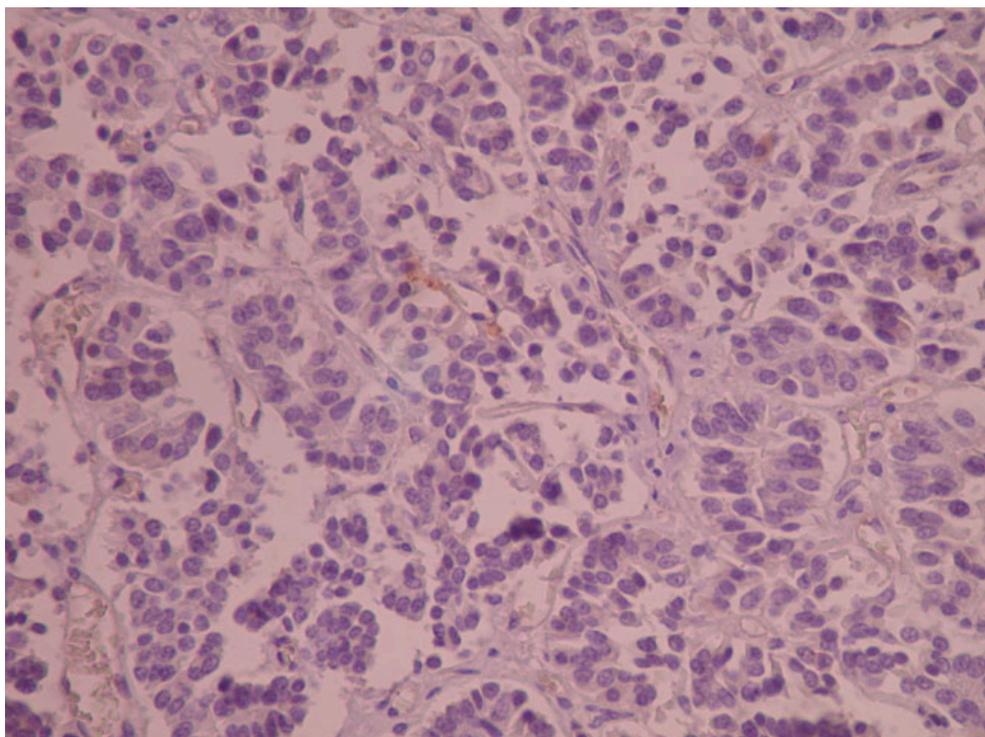


Figura 11: Carcinóide típico VEGFR-3 (B941347T) (X200)

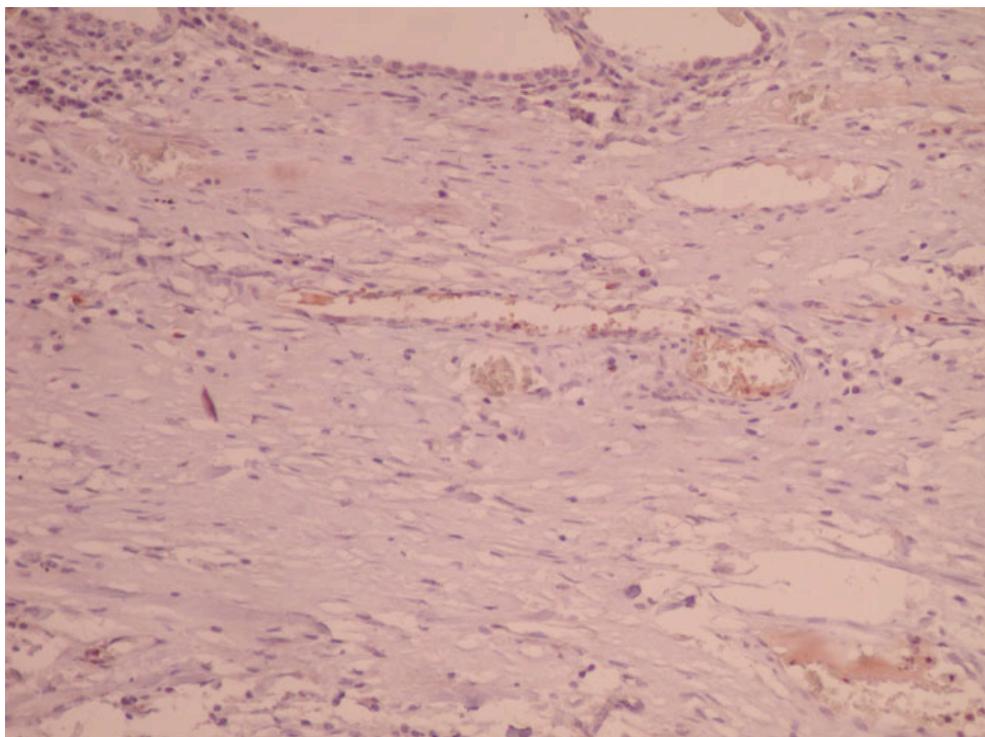


Figura 12: Carcinóide típico VEGFR-3 (0030812) (X400)

5.2 Análise univariada por comparação de médias

5.2.1 Gênero X Idade

Pelo teste de Kolgomorov-Smirnoff os valores da idade, em anos, tiveram distribuição paramétrica.

A média de idade \pm desvio padrão e erro padrão da média, em anos, dos pacientes por gênero foi:

- masculino: 50 \pm 16,8 e 1,9 anos.
- feminino: 43,1 \pm 17,2 e 1,7 anos.

Houve diferença significativa entre as médias das idades entre os pacientes dos gêneros masculino e feminino que foi de 7,1 anos, com intervalo de confiança de 95% entre 2 e 12 anos, com $p = 0,008$, pelo teste t de Student, assumida a igualdade entre as variâncias pelo teste de Levene.

5.2.2 Gênero X Diâmetro

Pelo teste de Kolgomorov-Smirnoff os valores do maior diâmetro tumoral, em milímetros, teve distribuição paramétrica.

A média \pm desvio padrão e erro padrão da média, em milímetros, dos pacientes por gênero foi:

- masculino: 26 \pm 16,3 mm e 1,9 mm.
- feminino: 26,2 \pm 15,3 mm e 1,5 mm.

Não houve diferença significativa entre as médias do diâmetro tumoral entre os pacientes dos gêneros masculino e feminino. Esta foi de 0,2 mm, com intervalo de confiança de 95% entre -4,9 e 4,4 com $p = 0,9$, pelo teste t de Student, assumida a igualdade entre as variâncias pelo teste de Levene.

5.2.3 Gênero X Número de linfonodos positivos

Pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff os valores do número de linfonodos positivos tiveram distribuição paramétrica.

A média \pm desvio padrão e erro padrão da média do número de linfonodos positivos dos pacientes por gênero foi:

- masculino: $0,3 \pm 0,8$ linfonodos positivos e $0,1$ linfonodos positivos.
- feminino: $0,2 \pm 0,5$ linfonodos positivos e $0,05$ linfonodos positivos.

Não houve diferença significativa entre as médias no número de linfonodos positivos entre os pacientes dos gêneros masculino e feminino. Esta foi de 0,2, com intervalo de confiança de 95% entre 0 e 0,4 com $p = 0,1$, pelo teste t de Student, assumida a igualdade entre as variâncias pelo teste de Levene.

5.3 Comparação entre os grupos com e sem metástase

Durante o acompanhamento das duas coortes, francesa e brasileira, em ambulatório especializado, houve 148 pacientes seguidos por mais de cinco anos sem metástase e 35 com metástase.

5.3.1 Idade

A média \pm desvio padrão e erro padrão da média da idade entre os grupos foi:

- sem metástase: $44,8 \pm 17,5$ anos e 1,4 anos.
- com metástase: $51,1 \pm 15,6$ anos e 2,7 anos.

A diferença entre as médias foi de 6 anos, com intervalo de confiança de 95% entre -12 e 0,02 anos ao teste t de Student ($p = 0,053$), assumindo-se a não igualdade de variância entre os grupos para a variável.

5.3.2 Diâmetro do tumor

A média \pm desvio padrão e erro padrão da média da idade entre os grupos foi:

- sem metástase: $24,6 \pm 14,7$ mm e 1,2 mm.
- com metástase: $32,4 \pm 18,2$ mm e 3,1 mm.

A diferença entre as médias foi de 8,1 mm, com intervalo de confiança de 95% entre -13,5 e -2 mm ao teste t de Student ($p = 0,009$), assumindo-se a igualdade de variância entre os grupos para a variável.

5.3.3 Gênero

A incidência de metástase entre as mulheres foi de 15,9% e entre os homens de 22,7%. Não houve diferença significativa segundo o Teste Exato de Fischer ($p = 0,17$). O risco relativo dos homens em ter metástase é de 1,4 vezes em relação às mulheres e o risco atribuído ao gênero masculino para ter metástase é de 6,8%.

5.3.4 Localização do tumor

A incidência de metástase segundo a localização do tumor primário, central ou periférica foi de 16,4% e 25%, respectivamente.

Não houve diferença significativa segundo o Teste Exato de Fischer ($p = 0,138$). O risco relativo dos tumores periféricos enviarem metástase, em relação aos centrais é de 1,5 e o risco atribuído ao gênero masculino para ter metástase é de 8,6%.

5.3.5 Margem comprometida e metástase hematogênica

A incidência de metástase segundo a margem livre ou comprometida histologicamente do tumor primário foi de 6% e 28,6% respectivamente.

Houve diferença significativa segundo o Teste Exato de Fischer ($p = 0,014$). O risco relativo dos tumores com margem comprometida enviarem metástase hematogênica, em relação aos tumores com margem

livre é de 4,8 e o risco atribuído ao gênero masculino para ter metástase é de 22,6%.

5.4 Regressão logística

5.4.1 Regressão logística para prever o “N” operatório

O modelo logístico não identifica equação que prediga a variável dependente binária “metástase linfática” em função das variáveis independentes incluídas no estudo..

Não houve identificação de variável independente clínica ou anatomopatológica preditiva do risco de metástase linfática segundo o modelo logístico.

5.4.2 Regressão logística para prever o “M” operatório

O modelo logístico identifica equação que prediga a variável dependente binária “metástase hematogênica”.

O diâmetro do tumor primário é uma variável independente preditiva do risco de metástase hematogênica. O exponencial de Beta para cada milímetro de aumento no diâmetro do tumor foi de 1.042, com intervalo de confiança de 95% entre 1.012 e 1.072, com nível de significância de 0.006. A identificação da variável é possível desde o primeiro degrau da análise condicional retrograda até o quarto e último (Apêndice 2).

O valor da constante é -4.951 no quarto e último degrau.

5.4.3 Regressão logística para prever o “NM” conjunto

O modelo logístico identifica equação que prediga a variável dependente binária “qualquer metástase (linfática ou hematogênica)”.

O diâmetro do tumor primário e a localização central ou periférica são variáveis independentes preditivas do risco de qualquer metástase (linfática ou hematogênica). O exponencial de Beta para cada milímetro de aumento no diâmetro do tumor foi de 1.037, com intervalo de confiança de 95% entre 1.013 e 1.062, com nível de significância de 0.002. A identificação da variável é possível desde o primeiro degrau da análise condicional retrograda até o terceiro e último. A posição periférica também é preditiva do risco de qualquer metástase, com exponencial de beta de 2.337, com intervalo de confiança de 95% entre 1.022 e 5.348, identificada no terceiro degrau (Apêndice 2).

O valor da constante é -2.700 no terceiro e último degrau.

5.5 LYVE-1

5.5.1 Teste de parametricidade para a variável IPI

Foi feito o teste de Kolgomorov-Smirnoff, os valores não têm distribuição paramétrica.

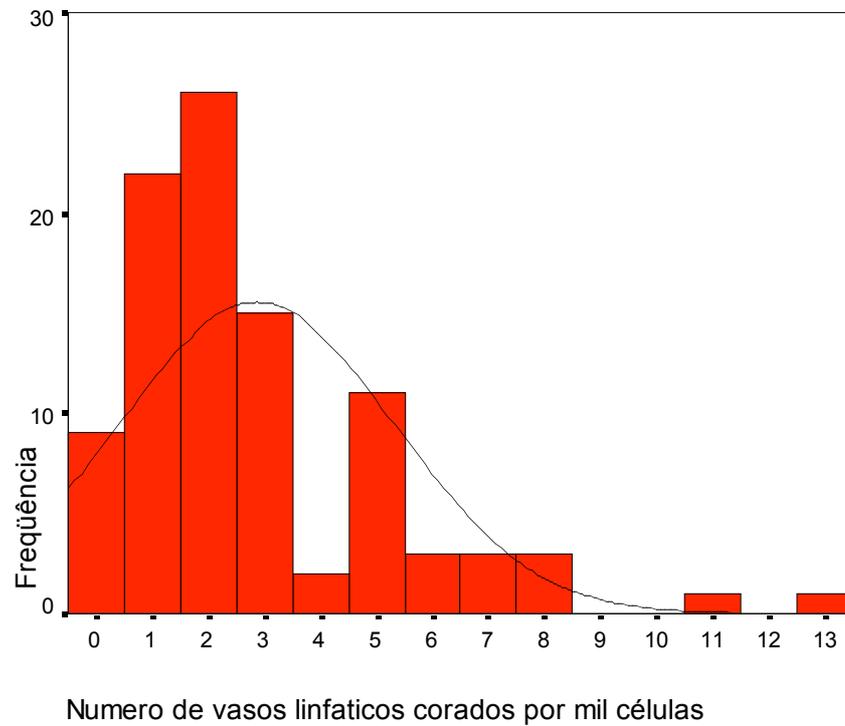


Gráfico 7 – Teste de parametricidade para LYVE-1

5.5.2 Comparação da mediana do IPI entre o grupo sem e com metástase linfática.

Não houve diferença da mediana do número de vasos linfaticos corados por mil células entre os grupos sem e com metástase linfática pelo teste de Mann-Whitney bicaudado ($p=0,965$).

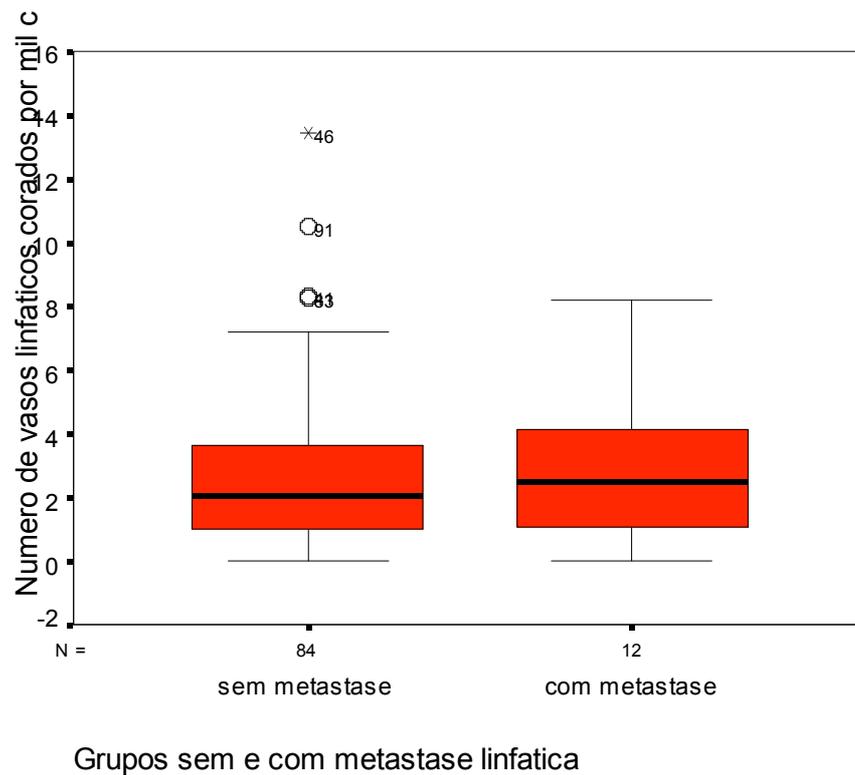


Gráfico 8 – Comparação da mediana do IPI entre os grupos com e sem metastase

5.5.3 Análise multivariada por regressão logística

O número de vasos linfáticos corados por mil células não foi identificado pelo modelo de regressão logística como uma variável independente preditiva do risco individual de metástase linfática.

No primeiro degrau da análise condicional retrograda, que incluiu seis variáveis candidatas a preditivas e a constante, já não houve identificação do número de vasos linfáticos corados por mil células como preditiva ($p=0.861$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Limitações do estudo

A discussão dos resultados só é válida se as limitações inerentes ao método escolhido forem analisadas. Dessa maneira evitamos a análise de dados que não representem a realidade.

6.2 Desenho epidemiológico

A escolha do desenho do estudo retrospectivo foi necessária, pois os estudos que utilizam modelos matemáticos de predição de risco individual de fenômenos binários só é factível quando é conhecido o desfecho a ser predito, no caso deste estudo, a metástase.

Além disso, o tumor carcinóide típico é doença rara e, portanto para alcançarmos uma casuística com maior chance de representar a realidade dessa doença foi necessário incluir todos os pacientes operados desde 1981.

Por se tratar de uma séria histórica, nos primeiros casos, não havia padronização para a coleta de dados e nem para a descrição em prontuário ou mesmo em laudos anatomopatológicos dos dados demográficos, clínicos e histopatológicos, não existindo uniformidade na descrição desses dados.

Deve-se salientar que no decorrer do período histórico em que os pacientes foram operados, não houve, uma padronização quanto à indicação e extensão da ressecção de linfonodos hilares e mediastinais ipsilaterais. Desta forma, a casuística é composta de pacientes cuja

ressecção linfática foi realizada de forma heterogênea. Há pacientes cuja dissecação não foi realizada, não sendo possível o estudo dessas estruturas. Mesmo não existindo consenso, alguns pacientes receberam dissecação linfática com extensão oncológica, tendo mais de vinte linfonodos dissecados. Esse tema será discutido no item 7.3.

Apesar da falta de uniformidade nos casos incluídos de forma retrospectiva, o estabelecimento do ambulatório especializado em tumores carcinóides broncopulmonares no HCFMUSP uniformizou a coleta de dados do prontuário através de uma ficha padrão para coleta prospectiva dos dados clínicos e radiológicos no período pré e pós-operatório e no acompanhamento dos doentes. Essas fichas já são utilizadas nos casos recrutados trabalhos em andamento após 2002, nos trabalhos em andamento.

Por não ser conhecido e estabelecido o papel terapêutico da extensão da dissecação linfática, não é eticamente aceito uma uniformização da extensão da dissecação linfática. Portanto, os dados relativos ao acometimento linfático continuam sendo colhidos de forma não-uniforme.

6.3 Tratamento

Como já mencionado, estudo retrospectivo agregou doentes tratados de forma não-uniforme no que se refere a dissecação linfática mediastinal e hilar ipsilateral ao tumor. Sabemos que a escolha do tratamento pode

influenciar na evolução da doença, portanto o ideal seria um desenho prospectivo controlado.

Na prática clínica atual, a dissecação linfática hilar e mediastinal ipsilateral não é obrigatória nos casos de ressecção de tumores carcinóides, pois não há evidência de que essa abordagem aumente o tempo livre de doença e de sobrevivência ou melhore a qualidade de vida do doente. Nem para outros carcinomas primários pulmonares existe consenso em relação ao papel terapêutico do esvaziamento dos linfonodos mediastinais.

A maioria dos Serviços de Cirurgia Torácica da Europa preconiza o esvaziamento radical dos linfonodos mediastinais nos tumores carcinóides. Entretanto, a exemplo da maioria dos serviços americanos, o HCFMUSP não preconiza esse tipo de exploração mediastinal para todos os pacientes. Dessa forma, a fim de se minimizar o possível viés de classificação de pacientes no grupo sem metástase linfática, foi realizado o seguimento ambulatorial com exame clínico e radiológico com tomografia computadorizada de tórax após um período superior a cinco anos de acompanhamento pós-operatório. Os pacientes que não apresentaram linfadenomegalia torácica detectada por esse método diagnóstico, após esse período, foram arbitrariamente considerados do grupo sem metástase linfática.

Porém, sabe-se que mesmo linfonodos acometidos por células malignas podem ter diâmetro inferior a um centímetro, e nos casos de neoplasias de baixo grau de malignidade, o aumento das dimensões dos linfonodos pode, teoricamente, ter uma velocidade muito baixa de

crescimento. Portanto, o fenômeno pode não ser detectado em apenas cinco anos.

Estudo em cadáver realizado em nosso meio pelo doutor Aurelino Schmidt evidenciou a presença de linfonodos com diâmetro maior que um centímetro na maioria dos cadáveres dissecados, provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) da capital de São Paulo, sendo na sua totalidade constituído por indivíduos que tiveram causa *mortis* não violenta, ou seja, velhice ou doença. Portanto, a população proveniente do SVO apresenta um viés de seleção, podendo ser considerada controle ideal apenas para cadáveres provindos do Instituto Médico Legal (IML), cujo óbito foi decorrente de causa violenta, e não necessariamente estavam doentes ou eram extremamente idosos. Porém, para controle de indivíduos vivos e sadios, a população proveniente do IML, cuja morte ocorreu na ausência de doença é a população mais favorável para ser considerada controle.

A constatação de linfadenomegalia em indivíduos considerados sadios dificulta ainda mais a determinação do comprometimento dos linfonodos apenas por exames de imagem. Entretanto, foi necessária a padronização de um método de avaliação dos linfonodos. Imagem tomográfica compatível com ausência de linfonodos maiores que um centímetro na população de pacientes vivos foi considerado um critério aceitável para considerar arbitrariamente indivíduos no grupo sem metástase linfática.

Na prática clínica e cirúrgica, observa-se que a presença de linfonodos com diâmetro aumentado não é prevalente nos indivíduos

seguidos após a ressecção do tumor carcinóide típico, acompanhada ou não de dissecação linfática mediastinal e hilar. Na presente casuística dois pacientes tiveram aumento do diâmetro desses linfonodos que ultrapassaram um centímetro: em um caso a metástase linfática foi diagnosticada através de mediastinoscopia realizada dois anos após o tratamento cirúrgico (lobectomia); em outro, a imagem suspeita desapareceu na tomografia de controle dois meses depois de ter surgido.

Dessa forma, a ausência de imagem sugestiva de linfonomegalia crônica foi a regra no acompanhamento dessa população, para a mesma ser arbitrariamente considerada sem comprometimento linfático e o indivíduo ser alocado no grupo sem metástase. Esse critério não exclui o risco de algum desses indivíduos ter metástase linfática que não se manifeste por aumento do diâmetro linfático, e este ser erroneamente considerado no grupo sem metástase. A investigação etiológica da linfadenomegalia no seguimento dos pacientes foi necessária apenas no caso descrito acima.

O uso do octreoscan foi considerado para o estudo do mediastino e do hilo pulmonar, porém por motivos logísticos realizou-se somente a tomografia computadorizada de tórax.

6.4 Tempo de acompanhamento

O tempo mínimo de seguimento determinado no estudo foi de cinco anos, entretanto o tempo ideal de seguimento para pacientes com lesão de

baixa taxa de proliferação, como o tumor carcinóide típico, é de pelo menos dez anos.

Para minimizar a interferência na avaliação de ocorrência de metástase, os pacientes que foram a óbito por doenças não relacionadas antes de cinco anos de seguimento, e que não tinham metástase no momento do óbito, foram excluídos da casuística. Porém, aqueles que no momento do óbito não relacionado ao tumor carcinóide já estavam acometidos por metástase (um paciente foi a óbito devido a um infarto agudo do miocárdio e apresentava metástase em clavícula e outro faleceu de causa operatória no segundo dia após a cirurgia, mas apresentava metástase linfática no ato operatório) foram incluídos no estudo da ocorrência de metástases.

6.5 Comprometimento linfático maligno à microscopia

Atualmente para determinar se o linfonodo ressecado apresenta comprometimento por células neoplásicas é utilizada a análise microscópica pela técnica tradicional de coloração pela hematoxilina-eosina. Aceita-se como definição de ausência de metástase a não detecção de células neoplásicas pela coloração HE, ao corte na porção mais equatorial do linfonodo.

É sabido que mesmo os linfonodos que não apresentam critérios de acometimento pelo método atual empregado, podem conter células neoplásicas metastáticas. Esse fenômeno é detectado por técnicas de

imuno-histoquímica, imunofluorescência *in situ* ou detecção de RNAm do tumor nos linfonodos. Detectado por qualquer técnica, o fenômeno é denominado micrometástase.

Para os carcinomas neuroendócrinos broncopulmonares, reações imuno-histoquímicas utilizando cromogranina-A, enolase neurônio específica e sinaptofisina podem identificar a presença de células tumorais. Se essa técnica for aplicada ao tecido dos linfonodos podemos evidenciar o fenômeno das micrometástases. Em nosso meio aceitamos a técnica tradicional para a determinação do comprometimento linfático por macrometástases e, portanto, não estamos incluindo os casos em que micrometástases podem estar presentes nos linfonodos, cuja análise tradicional os considerou como negativos para o acometimento neoplásico. Em nosso estudo adotamos o método tradicional para determinar o acometimento linfonodal, dessa maneira, nossa casuística pode apresentar um viés de seleção.

Para determinar o real comprometimento linfático, nosso grupo está desenvolvendo um estudo para determinar a ocorrência de micrometástase na população estudada. Essa técnica deve ser empregada para melhor compreensão do comportamento desses tumores. Esse projeto é desenvolvido pelo aluno de doutoramento Daniel Messias de Moraes Neto e resultados preliminares já foram apresentados no Congresso Mundial de Cirurgia Cardio-torácica na Grécia, em maio de 2008. Oito pacientes que não apresentaram macrometástases pela técnica tradicional de coloração por HE apresentaram micrometástase.

Porém, não é conhecido o significado clínico de eventuais micrometástases de tumores carcinóides típicos. Células individuais ou grupos de células que tenham atingido os sinusóides linfáticos podem não obter êxito na efetiva colonização do linfonodo. Pode ocorrer um completo desaparecimento dessas populações de células malignas nas estruturas linfáticas, o que explicaria a baixa prevalência de imagens sugestivas de linfonodomegalia em pacientes que ainda não tiveram seu mediastino dissecado.

O significado clínico das micrometástases linfáticas deve ser determinado, pois esse é um fenômeno que pode ter implicação na prática clínica. Com o advento de técnicas de radio-imagem diagnóstica e de terapias sistêmicas alvo contra células neuroendócrinas metastáticas é necessário que se conheça a implicação prognóstica dessas eventuais micrometástases. Em carcinomas broncopulmonares não neuroendócrinos, alguns grupos sugerem que se deva oferecer terapia sistêmica ou alvo adjuvante para indivíduos acometidos por micrometástases linfáticas, ainda que não tenham acometimento por macrometástases nessas estruturas.

6.6 Estudo imuno-histoquímico baseado em epítomos

Os anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica são produzidos contra uma determinada seqüência de aminoácidos de uma macromolécula protéica em sua conformação quaternária. A área na qual o

anticorpo se liga chama-se epítopo. Portanto, o anticorpo é produzido contra uma porção específica da proteína que desejamos estudar.

A afinidade do anticorpo por um epítopo de uma proteína não assegura que toda a estrutura da proteína esteja íntegra. Dessa forma, o uso de anticorpos contra epítopos de proteínas constitucionais ou funcionais não determina se essas proteínas estão íntegras ou ativas, respectivamente.

O VEGF-C e o VEGFR-3 são exemplos, respectivamente, de uma citocína e de um receptor de membrana citoplasmática, que apresentam atividade no processo de linfangiogênese. Entretanto, a sua mera identificação imuno-histoquímica não garante a integridade nem a função dessas proteínas.

Como o anticorpo é produzido contra um epítopo, outras estruturas que apresentem seqüências semelhantes podem ser coradas pela técnica de imuno-histoquímica. Portanto, é necessário um controle interno negativo para validar a imunomarcção da estrutura estudada. Em nosso estudo, apesar do uso de vários métodos de bloqueio de sítios inespecíficos, a imunomarcção do VEGF-C e do VEGFR-3 aconteceu de maneira absolutamente inespecífica. Ou seja, estruturas que não deveriam ser coradas pelos anticorpos apresentaram imunomarcção. Portanto, não foi possível determinar controle interno negativo e por isso a imunomarcção desses anticorpos não foi quantificada. A quantificação da imunomarcção pode não representar a condição biológica da estrutura analisada.

De maneira exploratória, para tentar identificar algum erro no método da imunomarcção com os anticorpos VEGF-C e VEGFR-3 nos carcinóides,

realizamos imuno-histoquímica com esses anticorpos em tecidos de tumores de tireóide e adenocarcinoma de pulmão, tecidos que sabidamente deveriam expressar imunopositividade para esses marcadores. Encontramos a mesma imunomarcção inespecífica identificada nos carcinóides típicos. Essa constatação nos faz acreditar que o epítipo utilizado pelo fabricante está direcionado para uma porção muito inespecífica da proteína a ser estudada, o que compromete a utilização desse anticorpo. Anticorpos contra o VEGF-C e VEGFR-3, produzidos por outros fabricantes, devem ser estudados em carcinóide típico para determinar se realmente a imunomarcção dessas moléculas não ocorre de forma específica no tecido estudado. Dessa maneira, poderíamos cercar a busca de uma resposta biológica do envolvimento dessas moléculas no processo de linfangiogênese em carcinóides típicos.

É necessário discutir se a ausência de controle interno negativo aconteceu porque a expressão do VEGF-C e do VEGFR-3 também acontece em outras estruturas, além das células tumorais envolvidas na linfangiogênese. Se isso realmente for uma verdade biológica o uso desses anticorpos não vai identificar as estruturas envolvidas somente no processo de linfangiogênese.

O LYVE-1 é um anticorpo produzido contra um epítipo de uma proteína estrutural do vaso linfático. Essa estrutura não se modifica no processo de linfangiogênese. Por ser uma proteína estrutural e específica para vasos linfáticos sua identificação é mais simples, pois o controle interno negativo é fácil de ser encontrado.

Pela primeira vez no Brasil, esse anticorpo específico para vasos linfáticos foi utilizado. Não há descrição na literatura indexada de estudos realizados no Brasil com esse anticorpo em nenhum tecido tumoral. A imunomarcagem do anticorpo LYVE-1 em carcinóides típicos se mostrou satisfatória e confiável, pois encontramos controle interno negativo adequado. O desenvolvimento da metodologia para quantificação do LYVE-1 encontrado em nosso estudo pode contribuir para futuros estudos sobre o envolvimento linfático no processo de linfangiogênese em outros tipos de tumores.

6.7 Discussão sobre os resultados

Foi possível prever o risco individual de metástase linfática em função do diâmetro do tumor primário e de metástase hematogênica em função do diâmetro e da localização periférica do tumor primário. Usar modelos matemáticos para calcular o risco individual de desenvolver metástase pode ser útil na prática clínica para uma melhor abordagem terapêutica clínica e cirúrgica, assim como para adequar o tempo e os exames utilizados para o acompanhamento pós-operatório.

A linfangiogênese é um fenômeno observado no parênquima dos carcinomas, é implicada como indispensável para que ocorra o fenômeno das metástases linfáticas e dessa forma, já foi considerada em alguns tumores como um fator preditivo e de prognóstico destas metástases. Apesar disso, não há relato na literatura indexada de estudos que a tenha

descrito, quantificado ou correlacionado com qualquer evento clínico em tumores carcinóides broncopulmonares.

Para a visualização dos vasos linfáticos intratumorais, utiliza-se a marcação das células de sua parede. Uma das formas de melhor os identificar é a marcação pela técnica de imuno-histoquímica. Porém, também não há na literatura indexada qualquer descrição de técnica imuno-histoquímica para a marcação de vasos linfáticos neoformados nesses tumores. Desta forma, foi necessário, durante os trabalhos deste estudo, a descoberta de qual a diluição do anticorpo primário contra o epítipo do LYVE-1 complementar ao marcador utilizado. Além da diluição, foi também necessário estabelecer qual o processamento ideal dos anticorpos secundários, do bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos e da peroxidase endógena para o binômio LYVE-1-tumor carcinóide broncopulmonar.

Para que se chegasse a tais resultados, foi necessária a realização de várias baterias de teste, porém, o tumor carcinóide típico pode ser considerado como um tumor não muito incidente, tornando os espécimes ressecados um material raro, exigindo uma decisão logística de não se realizar baterias que envolvessem um grande número de casos. Porém, como não se conhecia nem a presença, nem a densidade de vasos linfáticos neoformados no tumor estudado, havia o risco do resultado “negativo” gerar uma dúvida, pois há duas hipóteses ao menos que o explica. A primeira seria a real ausência de vasos nos espécimes, a segunda seria em consequência da técnica utilizada, e configuraria o falso negativo. Tal dúvida pode ser esclarecida pela marcação de células que servissem como controle

interno positivo da lâmina, porém, nem os macrófagos são considerados controle interno positivo para o LYVE-1. Como controle externo positivo foram utilizados tecidos benignos e malignos de outra natureza que não o tumor carcinóide, porém é sabido que tecidos de origem diversa podem expressar antígenos de forma não-uniforme, e não consistem no controle ideal da reação.

A ausência de controle interno positivo ideal descrito na literatura indexada não comprometeu a análise das lâminas, pois houve imunopositividade nos tumores corados. Porém, nesse momento houve necessidade de se estabelecer a diluição ideal, e tal objetivo foi completamente conquistado, e de forma inédita no continente latino americano para o LYVE-1 e para toda a literatura indexada para os tumores carcinóides.

Quanto ao controle interno negativo, observou-se a ausência de marcação em células não tumorais ao redor do parênquima tumoral, porém, a especificidade da marcação ainda não foi a ideal, pois observa-se ainda marcação de células benignas de epitélios adjacentes.

Para a imunomarcação ideal, sugerimos em estudos futuros a utilização de dois anticorpos contra proteínas estruturais do endotélio dos vasos linfáticos. Ou seja, realizar a dupla marcação, como por exemplo com o LYVE-1 e a podoplanina.

A marcação da parede dos vasos linfáticos foi obtida tanto na região do parênquima intratumoral quanto da região peritumoral região que circunda o parênquima tumoral. Não há descrição de qual área deve ser

considerada, optou-se pela quantificação das duas áreas em separado, e de um eventual estudo da correlação entre ambas. Iniciou-se pelo que intuitivamente parece ser o mais óbvio, que os vasos linfáticos neoformados que entram em contato com as células malignas no parênquima tumoral são provavelmente os melhores candidatos a permitirem o fenômeno de metástase por essa via.

Na literatura indexada, em outros tecidos neoplásicos a quantificação dos vasos linfáticos intratumorais foi um fator preditivo de tempo livre de doença e de metástase em neoplasias como de mama, endométrio, cólon, pulmão, próstata, ovário pâncreas e cabeça e pescoço^{169,170,171,172,173,174,175,176}. Entretanto essa relação não está estabelecida para todos os tumores e em carcinóides típicos nunca havia sido empregada.

A densidade de vasos linfáticos neoformados da área central do parênquima tumoral marcados pelo LYVE-1 não foi uma variável preditiva do risco individual de metástase linfática ou hematogênica. O significado funcional dessa descoberta ainda permanece incerto. Não se sabe se as células que têm maior potencial metastático são as do centro ou da periferia do tumor. Portanto, a quantificação da densidade de vasos linfáticos neoformados peritumorais e a correlação das densidades intra e peritumorais se fazem necessárias para uma melhor compreensão do envolvimento dos vasos linfáticos neoformados no desenvolvimento de metástase tanto linfática quanto hematogênica.

Tanto a neoformação de vasos linfáticos quanto a progressão espacial da célula até os mesmos, são fenômenos intimamente relacionados aos processos biomoleculares matriciais. O tecido tumoral causa desequilíbrio nas fibras da matriz^{107,108,109}, resultando em acúmulo ou diminuição destes componentes⁹⁸ caracterizando um fenótipo invasivo,^{98,110,111}. Novas e fortes evidências indicam que uma interação bem mais complexa entre as moléculas constitucionais e funcionais das células tumorais e do endotélio linfático é necessária para o desenvolvimento de metástase linfática¹⁶⁶. Portanto, talvez não seja o número de vasos linfáticos intra ou peritumorais, mas sua relação com estruturas da matriz que justifiquem o fenótipo invasivo, responsável pelo aparecimento de metástases linfáticas e hematogênicas.

Ao término do prazo para a conclusão do projeto, não houve tempo suficiente para a quantificação do fenômeno de linfangiogênese peritumoral. Sugerimos que o estudo da linfangiogênese prossiga com a quantificação da área peritumoral e sua relação com as áreas intratumoral, com a dupla imunomarcagem LYVE-1/podoplanina e com o uso de outros anticorpos contra VEGF-C e VEGFR-3 na tentativa de melhor entender esse fenômeno contribuindo assim, com um melhor entendimento do processo de desenvolvimento de metástase linfática e hematogênica em pacientes portadores de carcinóides típicos.

Outro fenômeno que talvez explique a ausência de diferença entre os grupos sem e com metástase linfática e a densidade de vasos linfáticos neoformados na área central do parênquima tumoral seja a alteração

histológica e funcional do linfonodo acometido. Neste trabalho não foi quantificada a densidade de vasos linfáticos dos linfonodos ressecados sem e com metástase, porém, a sua quantificação é o próximo passo natural para a melhor compreensão de uma eventual participação desses neovasos e a predisposição do paciente a sofrer de metástase linfática. Porém, pelo fato de haver mais de um milhar de linfonodos dissecados na nossa casuística, a análise de todos os espécimens exigiria um aparato logístico que fugiria ao escopo do presente projeto.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 Houve imunexpressão do LYVE-1 em tumores carcinóides típicos broncopulmonares. Houve imunexpressão do VEGF-C e do VEGFR-3 em tumores carcinóides típicos broncopulmonares porém, não foi possível encontrar um controle interno negativo.
- 7.1 Não houve diferença na imunexpressão dos imunomarcadores LYVE-1 entre os grupos de pacientes com e sem metástase (linfática ou hematogênica).
- 7.2 Foi possível prever o risco individual de metástase linfática em função do diâmetro do tumor primário.
- Foi possível prever o risco individual de metástase hematogênica em função do diâmetro e da localização periférica do tumor primário.
- Não foi possível prever o risco individual de metástase hematogênica ou linfática em função da imunexpressão do LYVE-1

8 REFERÊNCIAS

1. Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:55-81.
2. Fidler IJ. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: Editor. Book Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. 5th edna ed.: Lippincott-Raven; 1997. p.
3. Cotran RS, Kumar, V. and Tucker, C. Neoplasia. In: Editor. Book Neoplasia. 6th edna ed.: W.B.Saunders Co; 1999. p.
4. Creutzfeldt W. Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg.* 1996;20(2):126-31.
5. Feyrter F. [On the distinguishing features between bronchial carcinoid and bronchial muciparous adenoma]. *Frankf Z Pathol.* 1959;69:659-66.
6. Tani EM, Moraes HP and Bacchi CE. Tumores do pulmão: estudo cito-histológico, ultra-estrutural e imuno-histoquímico de 16 casos. *J Pneumol.* 1986;12(4):222-28.
7. Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L, Facciolo F and Martelli M. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(5):1781-5.
8. Gould PM, Bonner JA, Sawyer TE, Deschamps C, Lange CM and Li H. Bronchial carcinoid tumors: importance of prognostic factors that influence patterns of recurrence and overall survival. *Radiology.* 1998;208(1):181-5.
9. Coelho Filho JC, Bandeira AC and Alves VAF. Tumores carcinóides de pulmão - estudo comparativo entre as variantes clássica e atípica com

ênfase ao seguimento clínico e aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos. *J pneumol*. 1988;14(3):127-32.

10. Skuladottir H, Hirsch FR, Hansen HH and Olsen JH. Pulmonary neuroendocrine tumors: incidence and prognosis of histological subtypes. A population-based study in Denmark. *Lung Cancer*. 2002;37(2):127-35.

11. Berge T and Linell F. Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. 1976;84(4):322-30.

12. das Neves Pereira JC, da Silva AG, Soares F, Ab'Saber AM, Schmidt A, Rodrigues OR, Garippo A, Capelozzi M, de Campos JR, Takagaki T, Jatene FB, Martins S and Capelozzi VL. Nuclear and environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. *Pathol Res Pract*. 2004;200(6):459-67.

13. 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. In: Editor. Book De l'auscultation médiate ou traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur: fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration. 3rd eda ed.: Chaudé; 1831. p.

14. Lubarsch O. Über den primären krebs des ileum, nebst bemerkungen über das gleichzeitige vorkommen von krebs und tuberculose. *Virchows Arch*. 1888;111:280-370.

15. Oberndorfer S. Karzinoid Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol*. 1907;1:425-28.

16. Engelbreth-Holm J. Benign bronchial adenomas. *Acta Chir Scand.* 1944;90:383-409.
17. Arrigoni MG, Woolner LB and Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972;64(3):413-21.
18. Thomas CF, Jr., Tazelaar HD and Jett JR. Typical and atypical pulmonary carcinoids : outcome in patients presenting with regional lymph node involvement. *Chest.* 2001;119(4):1143-50.
19. Warren WH, Gould VE, Faber LP, Kittle CF and Memoli VA. Neuroendocrine neoplasms of the bronchopulmonary tract. A classification of the spectrum of carcinoid to small cell carcinoma and intervening variants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;89(6):819-25.
20. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA and Warren WH. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol Annu.* 1983;18 Pt 1:287-330.
- 21.
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Histological typing of lung tumors. *Am J Clin Pathol.* 1982;77:123-36.
23. Travis D. BE and C. M-HHKaHC. World Health Organization. Classification of lung and peural tumos. {online}. 2004. Available from:
24. Huang Q, Muzitansky A and Mark EJ. Pulmonary neuroendocrine carcinomas. A review of 234 cases and a statistical analysis of 50 cases treated at one institution using a simple clinicopathologic classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(5):545-53.

25. Travis WD, Gal AA, Colby TV, Klimstra DS, Falk R and Koss MN. Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. *Hum Pathol.* 1998;29(3):272-9.
26. Hage E. Histochemistry and fine structure of bronchial carcinoid tumours. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat.* 1973;361(2):121-8.
27. Paladugu RR, Benfield JR, Pak HY, Ross RK and Teplitz RL. Bronchopulmonary Kulchitzky cell carcinomas. A new classification scheme for typical and atypical carcinoids. *Cancer.* 1985;55(6):1303-11.
28. Bensch KG, Gordon GB and Miller LR. Electron Microscopic and Biochemical Studies on the Bronchial Carcinoid Tumor. *Cancer.* 1965;18:592-602.
29. Taylor W. Pulmonary argyrophil cells at high altitude. *J Pathol.* 1977;122(3):137-44.
30. Froelich F. Die "helle-zelle" der bronchialshlenhaut und ihre beziehungen zum problem der chemorezeptoren. *Frankf Z Pathol.* 1949;60:517-22.
31. Lawuveryns JM and Peuskens JC. Neuroepithelial bodies (neuroepithelial organ?) in human infant bronchial and bronchiolar epithelium. *Anat Rec.* 1972;172:471-76.
32. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA and Warren WH. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest.* 1983;49(5):519-37.

33. Reznik-Schüller H. Proliferation of endocrine (APUD-type) cells during early N-diethylnitrosamine-induced lung carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* 1976;1:255-59.
34. Reznik-Schüller H. Ultrastructural alterations of APUD cells during nitrosamine-induced lung carcinogenesis. *J Pathol.* 1977;121:79-83.
35. Wang JC, Shi DR, Fu XL, Lu WP, Shi FJ and Lu CL. [Analysis of clinicopathologic features and morphogenesis of carcinoid tumorlets in the lung with bronchiectasis]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2003;32(4):350-3.
36. Queiroz AC. Quimiodectomas microscópicos do pulmão. *Acta Med Port.* 1979;1:689-95.
37. Mills SE, Cooper PH, Walker AN and Kron IL. Atypical carcinoid tumor of the lung. A clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Surg Pathol.* 1982;6(7):643-54.
38. Grote TH, Macon WR, Davis B, Greco FA and Johnson DH. Atypical carcinoid of the lung. A distinct clinicopathologic entity. *Chest.* 1988;93(2):370-5.
39. 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.
40. Lin O, Olgac S, Green I, Zakowski MF and Klimstra DS. Immunohistochemical staining of cytologic smears with MIB-1 helps distinguish low-grade from high-grade neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(2):209-16.

41. Hasleton PS. Histopathology and prognostic factors in bronchial carcinoid tumours. *Thorax*. 1994;49 Suppl:S56-62.
42. Dusmet M and McKneally MF. Bronchial and thymic carcinoid tumors: a review. *Digestion*. 1994;55 Suppl 3:70-6.
43. Bonato M, Cerati M, Pagani A, Papotti M, Bosi F, Bussolati G and Capella C. Differential diagnostic patterns of lung neuroendocrine tumours. A clinico-pathological and immunohistochemical study of 122 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(3):201-11.
44. Thorson AH. Studies on carcinoid disease. *Acta Med Scand Suppl*. 1958;334:1-132.
45. Jensen RT, Norton, J.A. Carcinoid tumors and the carcinoid syndrome. In: Editor. Book Carcinoid tumors and the carcinoid syndrome. ed.: Lippincott- Raven; 1997. p.
46. Mentzer SJ, Myers DW and Sugarbaker DJ. Sleeve lobectomy, segmentectomy, and thoracoscopy in the management of carcinoma of the lung. *Chest*. 1993;103(4 Suppl):415S-7S.
47. Cooper DK and Belcher JR. Conservative surgery for bronchial adenomata. *Thorax*. 1976;31(1):44-8.
48. Stamatis G, Freitag L and Greschuchna D. Limited and radical resection for tracheal and bronchopulmonary carcinoid tumour. Report on 227 cases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1990;4(10):527-32; discussion 33.
49. Marty-Ane CH, Costes V, Pujol JL, Alauzen M, Baldet P and Mary H. Carcinoid tumors of the lung: do atypical features require aggressive management? *Ann Thorac Surg*. 1995;59(1):78-83.

50. Schrevens L, Vansteenkiste J, Deneffe G, De Leyn P, Verbeken E, Vandenberghe T and Demedts M. Clinical-radiological presentation and outcome of surgically treated pulmonary carcinoid tumours: a long-term single institution experience. *Lung Cancer*. 2004;43(1):39-45.
51. Ximenes Netto M MJG. Adenoma Brônquico. *Rev Bras Cir*. 1972;62:13-6.
52. Harpole DH, Jr., Feldman JM, Buchanan S, Young WG and Wolfe WG. Bronchial carcinoid tumors: a retrospective analysis of 126 patients. *Ann Thorac Surg*. 1992;54(1):50-4; discussion 4-5.
53. Filosso PL, Ruffini E, Oliaro A, Papalia E, Donati G and Rena O. Long-term survival of atypical bronchial carcinoids with liver metastases, treated with octreotide. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002;21(5):913-7.
54. Torre M, Barberis M, Barbieri B, Bonacina E and Belloni P. Typical and atypical bronchial carcinoids. *Respir Med*. 1989;83(4):305-8.
55. Okike N, Bernatz PE and Woolner LB. Carcinoid tumors of the lung. *Ann Thorac Surg*. 1976;22(3):270-7.
56. Stolz B, Smith-Jones P, Albert R, Weckbecker G and Bruns C. New somatostatin analogues for radiotherapy of somatostatin receptor expressing tumours. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1999;31 Suppl 2:S224-6.
57. Simonenko VB, Dulin PA and Makanin MA. [Somatostatin analogues in treatment of gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumors]. *Klin Med (Mosk)*. 2006;84(4):4-8.
58. Kunikowska J, Krolicki L, Cwikla J, Mikołajczak R, Pawlak D, Korsak A, Kozłowicz I, Poprawski J, Plazinska M, Kobylecka M, Maczewska J,

- Zycinska K and Wardyn K. [Radioisotope therapy with somatostatin analogues in neuroendocrine tumours (case report)]. *Endokrynol Pol.* 2005;56(1):46-54.
59. Oberg K EB. Medical treatment of neuroendocrine gut and pancreatic tumors. *Acta Oncol.* 1989;28:425.
60. Moertel CG, Rubin J and Kvols LK. Therapy of metastatic carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome with recombinant leukocyte A interferon. *J Clin Oncol.* 1989;7(7):865-8.
61. Moertel CG. Treatment of the carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome. *J Clin Oncol.* 1983;1(11):727-40.
62. Moertel CG and Hanley JA. Combination chemotherapy trials in metastatic carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome. *Cancer Clin Trials.* 1979;2(4):327-34.
- 63.
64. Soga J and Tazawa K. Pathologic analysis of carcinoids. Histologic reevaluation of 62 cases. *Cancer.* 1971;28(4):990-8.
65. Alves VAF, Bacchi CE and Vassallo J. Manual de imuno-histoquímica. In: Editor. Book Manual de imuno-histoquímica. ed.: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.
66. Ximenes Netto M. Recentes avanços em câncer do pulmão. *HFA - Publi Tec Cient.* 1987;2(1):65-77.
67. Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, Tateishi M, Sugio K and Sugimachi K. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar

organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res.* 1993;53(20):5000-3.

68. Demarchi LM, Reis MM, Palomino SA, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, Saldiva PH and Capelozzi VL. Prognostic values of stromal proportion and PCNA, Ki-67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2000;13(5):511-20.

69. Kawamata H, Kameyama S, Kawai K, Tanaka Y, Nan L, Barch DH, Stetler-Stevenson WG and Oyasu R. Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *Int J Cancer.* 1995;63(4):568-75.

70. McCaughan BC, Martini N and Bains MS. Bronchial carcinoids. Review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;89(1):8-17.

71. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M and Rilke F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol.* 1997;15(8):2858-65.

72. Carvalho PE, Antonangelo L, Bernardi FD, Leao LE, Rodrigues OR and Capelozzi VL. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2000;30(11):478-86.

73. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U and Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.

74. Crotti PLR. *Valor prognóstico de marcadores tumorais imuno-histoquímicos, morfometria e regiões organizadoras de nucléolos (NORs) na sobrevida de pacientes com tumor carcinóide pulmonar* {Tese}. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 1996.
75. Matheus RS. *Relevância de parâmetros morfológicos e biológicos ("star volume", índice mitótico, AgNOR e Ki67) em carcinoma pulmonar dos tipos histológicos de células não pequenas e suas metástases hematogênicas* {Tese}. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 2000.
76. Arbiser ZK, Arbiser JL, Cohen C and Gal AA. Neuroendocrine lung tumors: grade correlates with proliferation but not angiogenesis. *Mod Pathol.* 2001;14(12):1195-9.
77. Ab' Saber AM, Massoni Neto LM, Bianchi CP, Ctenas BB, Parra ER, Eher EM, Pereira JC, Takagaki T, Yamaguchi NH and Capelozzi VL. Neuroendocrine and biologic features of primary tumors and tissue in pulmonary large cell carcinomas. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(6):1883-90.
78. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P and et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989;342(6250):705-8.
79. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H and et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene.* 1990;5(10):1603-10.

80. McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, Harris A, Lane D and Gatter KC. The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer*. 1992;66(4):735-8.
81. Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrini S, Pepe S, Macchiarini P, Chella A, Angeletti CA, Callahan R and et al. p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res*. 1993;53(12):2846-51.
82. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T and Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992;70(6):923-35.
83. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE and Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res*. 1992;52(17):4828-31.
84. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V, Lucchi M, Mussi A, Angeletti CA and Bevilacqua G. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*. 1998;34(5):718-23.
85. Robbins SL, Cotran RS and Kumar V. Pathologic bases of disease. In: Editor. Book Pathologic bases of disease. 4th ed.: W B Saunders Company; 1989. p.
86. Kobayashi Y, Tokuchi Y, Hashimoto T, Hayashi M, Nishimura H, Ishikawa Y, Nakagawa K, Sato Y, Takahashi A and Tsuchiya E. Molecular markers for reinforcement of histological subclassification of neuroendocrine lung tumors. *Cancer Sci*. 2004;95(4):334-41.

87. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281(5381):1322-6.
88. Buendia B, Santa-Maria A and Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 11):1743-53.
89. Yurchenco PD, Smirnov S and Mathus T. Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins. *Methods Cell Biol*. 2002;69:111-44.
90. Ohori NP, Yousem SA, Griffin J, Stanis K, Stetler-Stevenson WG, Colby TV and Sonmez-Alpan E. Comparison of extracellular matrix antigens in subtypes of bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(7):675-86.
91. Cox G, Steward WP and O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax*. 1999;54(2):169-79.
92. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro JY, Lee JJ, Tu N, Hittelman WN and Hong WK. Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol*. 1995;13(8):1893-903.
93. Liotta LA. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. *Am J Pathol*. 1984;117(3):339-48.
94. Liotta LA, Rao CN and Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*. 1983;49(6):636-49.

95. Watanabe N, Nakajima I, Abe S, Ogura S, Isobe H and Kawakami Y. Staining pattern of type IV collagen and prognosis in early stage adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol*. 1994;47(7):613-5.
96. Grigioni WF, Biagini G, Garbisa S, D'Errico A, Milani M, Mastroilli M, Vasi V, Villanacci V, Gozzetti G and Mancini AM. Immunohistochemical study of basement membrane antigens in bronchioloalveolar carcinoma. *Am J Pathol*. 1987;128(2):217-24.
97. Fukushima M, Fukuda Y, Kawamoto M and Yamanaka N. Elastosis in lung carcinoma: Immunohistochemical, ultrastructural and clinical studies. *Pathol Int*. 2000;50(12):1004-13.
98. Eto T, Suzuki H, Honda A and Nagashima Y. The changes of the stromal elastotic framework in the growth of peripheral lung adenocarcinomas. *Cancer*. 1996;77(4):646-56.
99. Martinez-Hernandez A and Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest*. 1983;48(6):656-77.
100. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G and Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J*. 2001;20(4):672-82.
101. Terranova VP, Hujanen ES and Martin GR. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 1986;77(2):311-6.

102. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y and Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int.* 1997;47(7):461-9.
103. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):422-33.
104. Junqueira LC and Carneiro J. Histologia básica. In: Editor. Book Histologia básica. 6ª ed.: Guanabara Koogan; 1985. p.
105. Vracko R and Benditt EP. Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. *J Cell Biol.* 1972;55(2):406-19.
106. Kiyohara T, Kumakiri M, Kobayashi H, Ohkawara A and Lao LM. Atrophic dermatofibroma. Elastophagocytosis by the tumor cells. *J Cutan Pathol.* 2000;27(6):312-5.
107. Grosso LE. Synthesis of elastin by pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(1):5-9.
108. Remmele W, Dietz M, Schmidt F and Schicketanz KH. Relation of elastosis to biochemical and immunohistochemical steroid receptor findings, Ki-67 and epidermal growth factor receptor (EGFR) immunostaining in invasive ductal breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;422(4):319-26.
109. Feinmesser M, Schachter JM, Tobar A, Sulkes J, Gutman H, Kruk N and Okon E. Relationship of tumorigenic malignant melanomas to dermal elastin: an expression of tumor/stromal interaction that may be related to prognosis. *Am J Dermatopathol.* 2002;24(2):108-17.

110. Pai MR, Pai KN, Rao RV, Naik R, Shankarnarayana and Baliga P. Connective tissue stromal changes in tumours and tumour-like lesions of the breast. *Indian J Pathol Microbiol.* 1999;42(3):327-32.
111. Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L and Verdetti J. Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):2967-72.
112. Melis M, Baiocchini A, Soda G and Bosco D. Tenascin expression in elastotic cuffs of invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract.* 1997;193(7):479-84.
113. Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W and Bernard P. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol.* 2004;122(2):256-65.
114. Lohmann W, Schill WB, Bucher D, Peters T, Nilles M, Schulz A and Bohle R. Elastosis and cancer. *Z Naturforsch [C].* 1994;49(3-4):223-9.
115. Bergers G and Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401-10.
116. Papetti M and Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(5):C947-70.
117. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL and Gatter KC. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3(12 Pt 1):2485-92.

118. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, De Placido S, Basolo F, Angeletti CA and Bevilacqua G. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(12):881-6.
119. Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(2):94-5.
120. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(1):4-6.
121. Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, Chine S, Angeletti CA, Harris AL and Bevilacqua G. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 1995;177(1):57-63.
122. Shayan R, Achen MG and Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis.* 2006;27(9):1729-38.
123. Sherman AI and Ter-Pogossian M. Lymph-node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection. *Cancer.* 1953;6(6):1238-40.
124. Cochran AJ, Wen DR and Morton DL. Management of the regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *World J Surg.* 1992;16(2):214-21.
125. Kato S. Organ specificity of the structural organization and fine distribution of lymphatic capillary networks: histochemical study. *Histol Histopathol.* 2000;15(1):185-97.

126. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M and Jackson DG. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol.* 1999;144(4):789-801.
127. He Y, Karpanen T and Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1654(1):3-12.
128. Kato S, Shimoda H, Ji RC and Miura M. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anat Sci Int.* 2006;81(2):71-83.
129. Oliver G and Harvey N. A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;979:159-65; discussion 88-96.
130. Oliver G and Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev.* 2002;16(7):773-83.
131. Gerli R, Solito R, Weber E and Agliano M. Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics. *Lymphology.* 2000;33(4):148-57.
132. Weber E, Rossi A, Solito R, Sacchi G, Agliano M and Gerli R. Focal adhesion molecules expression and fibrillin deposition by lymphatic and blood vessel endothelial cells in culture. *Microvasc Res.* 2002;64(1):47-55.
133. Thiele W and Sleeman JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J Biotechnol.* 2006;124(1):224-41.
134. Veikkola T, Lohela M, Ikenberg K, Makinen T, Korff T, Saaristo A, Petrova T, Jeltsch M, Augustin HG and Alitalo K. Intrinsic versus

microenvironmental regulation of lymphatic endothelial cell phenotype and function. *Faseb J.* 2003;17(14):2006-13.

135. Scavelli C, Weber E, Agliano M, Cirulli T, Nico B, Vacca A and Ribatti D. Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Anat.* 2004;204(6):433-49.

136. Petrova TV, Karpanen T, Norrmen C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaschki D, Mortimer P, Yla-Herttuala S, Miura N and Alitalo K. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med.* 2004;10(9):974-81.

137. Cupedo T, Kraal G and Mebius RE. The role of CD45+CD4+CD3- cells in lymphoid organ development. *Immunol Rev.* 2002;189:41-50.

138. Cupedo T and Mebius RE. Cellular interactions in lymph node development. *J Immunol.* 2005;174(1):21-5.

139. McGeown JG, McHale NG and Thornbury KD. The role of external compression and movement in lymph propulsion in the sheep hind limb. *J Physiol.* 1987;387:83-93.

140. McGeown JG, McHale NG and Thornbury KD. Arterial pulsation and lymph formation in an isolated sheep hindlimb preparation. *J Physiol.* 1988;405:595-604.

141. McGeown JG, McHale NG and Thornbury KD. Effects of varying patterns of external compression on lymph flow in the hindlimb of the anaesthetized sheep. *J Physiol.* 1988;397:449-57.

142. Ji RC and Kato S. Histochemical analysis of lymphatic endothelial cells in lymphostasis. *Microsc Res Tech.* 2001;55(2):70-80.
143. Kato S. Enzyme-histochemical identification of lymphatic vessels by light and backscattered image scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 1990;65(3):131-7.
144. Kato S, Itonaga I, Ji RC and Miura M. Enzyme triple staining for differentiation of lymphatics from venous and arterial capillaries. *Lymphology.* 1996;29(1):15-9.
145. Ezaki T, Matsuno K, Fujii H, Hayashi N, Miyakawa K, Ohmori J and Kotani M. A new approach for identification of rat lymphatic capillaries using a monoclonal antibody. *Arch Histol Cytol.* 1990;53 Suppl:77-86.
146. Wigle JT and Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell.* 1999;98(6):769-78.
147. Carreira CM NS, diTomaso et al. LYVE-1 is not restricted to lymph vessels: Expression in normal liver sinusoids and down regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 2000;61:8079-84.
148. Swartz MA and Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech.* 2001;55(2):92-9.
149. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG and Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(7):716-9.
150. Jackson DG, Prevo R, Clasper S and Banerji S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 2001;22(6):317-21.

151. Alitalo K and Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002;1(3):219-27.
152. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K and Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*. 1995;203(1):80-92.
153. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N and Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*. 1996;15(7):1751.
154. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K and Kerjaschki D. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*. 1999;154(2):385-94.
155. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME and Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):573-83.
156. Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, Mehrotra S and Badve S. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(11):1449-55.
157. Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Colpaert CG, Van Laere SJ, van Dam P, Van Marck EA, Dirix LY and Vermeulen PB. Tumor

lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7637-42.

158. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):453-8.

159. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ and Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992;127(4):392-9.

160. Ferris RL, Xi L, Raja S, Hunt JL, Wang J, Gooding WE, Kelly L, Ching J, Luketich JD and Godfrey TE. Molecular staging of cervical lymph nodes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 2005;65(6):2147-56.

161. Bilchik AJ, Giuliano A, Essner R, Bostick P, Kelemen P, Foshag LJ, Sostrin S, Turner RR and Morton DL. Universal application of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in solid neoplasms. *Cancer J Sci Am.* 1998;4(6):351-8.

162. Nieweg OE, Tanis PJ and Kroon BB. The definition of a sentinel node. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(6):538-41.

163. Leong SP. Selective sentinel lymphadenectomy for malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 2003;83(1):157-85, vii.

164. Bilchik AJ, Nora DT, Saha S, Turner R, Wiese D, Kuo C, Ye X, Morton DL and Hoon DS. The use of molecular profiling of early colorectal cancer to predict micrometastases. *Arch Surg.* 2002;137(12):1377-83.

165. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res.* 2001;7(3):462-8.

166. Qian F, Hanahan D and Weissman IL. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3976-81.
167. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL and Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002;296(5574):1883-6.
168. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K and Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*. 2000;60(16):4324-7.
169. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ and Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2005;206(2):170-7.
170. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, Emoto M, Sakamoto A, Sakamoto T, Maruyama H, Sato S, Mizunuma H and Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9(4):1361-9.
171. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, Emoto M, Umemoto M, Sakamoto T, Sato S, Mizunuma H and Smith SK. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. 2003;88(2):237-44.

172. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I and Dome B. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7344-53.
173. Wang TB, Huang YH, Lan P, Song XM and Wang JP. [Correlation of lymphangiogenesis to progression of colorectal cancer]. *Ai Zheng.* 2005;24(10):1276-9.
174. Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG, Sutherland RL and Williams ED. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate.* 2005;65(3):222-30.
175. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, Kubista E, Hausmaninger H, Samonigg H, Gnant M, Jakesz R and Horvat R. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004;240(2):306-12.
176. Sipos B, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Kerjaschki D and Kloppel G. Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors. *Am J Pathol.* 2004;165(4):1187-97.
177. Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T, Schoppmann SF, Kittler H and Pehamberger H. Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 2004;40(3):358-64.
178. White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J and Murray JC. Vascular endothelial growth factor-D

expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(6):1669-75.

179. Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuni T, Kimura S, Tanaka S, Matsumura S, Yasui W and Chayama K. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer.* 2005;115(3):388-92.

180. Rubbia-Brandt L, Terris B, Giostra E, Dousset B, Morel P and Pepper MS. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res.* 2004;10(20):6919-28.

181. Stacker SA, Williams RA and Achen MG. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *Apmis.* 2004;112(7-8):539-49.

182. Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL and Jackson DG. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol.* 2003;200(2):195-206.

183. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V and Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development.* 1996;122(12):3829-37.

184. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, Roufail S, Simpson RJ, Moritz R, Karpanen T, Alitalo K and Achen MG. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem.* 1999;274(45):32127-36.

185. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA and Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med.* 2003;198(6):863-8.
186. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N and Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J.* 1997;16(13):3898-911.
187. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U and Alitalo K. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol.* 1997;173(2):211-5.
188. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S and Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med.* 2001;7(2):199-205.
189. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK and Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 1997;276(5317):1423-5.
190. McColl BK, Stacker SA and Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Apmis.* 2004;112(7-8):463-80.
191. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103(2):211-25.

192. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG and Alitalo K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *Embo J*. 2001;20(17):4762-73.
193. Achen MG, Roufail S, Domagala T, Catimel B, Nice EC, Geleick DM, Murphy R, Scott AM, Caesar C, Makinen T, Alitalo K and Stacker SA. Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor-D block its interactions with both VEGF receptor-2 and VEGF receptor-3. *Eur J Biochem*. 2000;267(9):2505-15.
194. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H and Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*. 2001;7(2):186-91.
195. Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai Y, Takabayashi A, Alitalo K, Yamaoka Y and Nishikawa SI. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood*. 2000;96(2):546-53.
196. Persaud K, Tille JC, Liu M, Zhu Z, Jimenez X, Pereira DS, Miao HQ, Brennan LA, Witte L, Pepper MS and Pytowski B. Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 13):2745-56.

197. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M and Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 2001;61(5):1786-90.
198. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T and Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(11):819-25.
199. Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, Wiltling J and Sleeman JP. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res.* 2003;63(3):713-22.
200. Kirkin V, Mazitschek R, Krishnan J, Steffen A, Waltenberger J, Pepper MS, Giannis A and Sleeman JP. Characterization of indolinones which preferentially inhibit VEGF-C- and VEGF-D-induced activation of VEGFR-3 rather than VEGFR-2. *Eur J Biochem.* 2001;268(21):5530-40.
201. Lin B, Podar K, Gupta D, Tai YT, Li S, Weller E, Hideshima T, Lentzsch S, Davies F, Li C, Weisberg E, Schlossman RL, Richardson PG, Griffin JD, Wood J, Munshi NC and Anderson KC. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res.* 2002;62(17):5019-26.

202. Ruggeri B, Singh J, Gingrich D, Angeles T, Albom M, Yang S, Chang H, Robinson C, Hunter K, Dobrzanski P, Jones-Bolin S, Pritchard S, Aimone L, Klein-Szanto A, Herbert JM, Bono F, Schaeffer P, Casellas P, Bourie B, Pili R, Isaacs J, Ator M, Hudkins R, Vaught J, Mallamo J and Dionne C. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res.* 2003;63(18):5978-91.
203. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G and Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-109.
204. Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y and Alitalo K. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8868-73.
205. Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, Fannon M, Chen EJ, Butterfield C, Moses MA, Mulligan RC, Folkman J and Kaipainen A. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11658-63.
206. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsarlis K, Dissing S, Ohhashi T, Jackson DG and Cao

- Y. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*. 2004;6(4):333-45.
207. Morisada T, Oike Y, Yamada Y, Urano T, Akao M, Kubota Y, Maekawa H, Kimura Y, Ohmura M, Miyamoto T, Nozawa S, Koh GY, Alitalo K and Suda T. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood*. 2005;105(12):4649-56.
208. Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I and Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *Embo J*. 2005;24(16):2885-95.
209. Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A and Sheppard D. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4544-52.
210. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T and Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1499-504.
211. Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, Jeltsch M, Petrova TV, Pytowski B, Stacker SA, Yla-Herttuala S, Jackson DG, Alitalo K and McDonald DM. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2005;115(2):247-57.
212. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K and Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med*. 2001;7(2):192-8.

213. Matzkin H, Patel JP, Altwein JE and Soloway MS. Stage T1A carcinoma of prostate. *Urology*. 1994;43(1):11-21.
214. Hamada K, Oike Y, Takakura N, Ito Y, Jussila L, Dumont DJ, Alitalo K and Suda T. VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. *Blood*. 2000;96(12):3793-800.
215. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K and Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2002;161(3):947-56.
216. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Zuzarte M, Lutjens P, Muller R and Havemann K. Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol*. 2001;80(1):99-110.
217. Spliet WG, Aronica E, Ramkema M, Witmer AN, Schlingemann RO, de Jong JM and Troost D. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor receptors-1, -2 and -3 in human spinal cord: altered expression in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30(4):351-9.
218. Witmer AN, Dai J, Weich HA, Vrensen GF and Schlingemann RO. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(6):767-77.
219. Witmer AN, Blaauwgeers HG, Weich HA, Alitalo K, Vrensen GF and Schlingemann RO. Altered expression patterns of VEGF receptors in human

diabetic retina and in experimental VEGF-induced retinopathy in monkey.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43(3):849-57.

220. www.onyx-pharm.com. {online}. Available from: www.onyx-pharm.com

221. www.pfizer.com. {online}. Available from: www.pfizer.com

222. Kirshbom PM and Harpole DH. Bronchial gland tumors. In: F. G. Pearson, J. D. Cooper, J. Deslauriers, R. J. Ginsberg, C. A. Hiebert, G. A. Patterson and H. C. Urschel. Thoracic surgery. 2nda ed.: Churchill Livingstone; 2002. p. 763-71.

223. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A and et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis.* 1988;96(5):379-94.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Tabela 2: Dados demográficos

n. paciente	Gênero Masculino(M) Feminino (F)	Idade (anos)	Localizacao central (C) periférica (P)	Margem comprometida (1) livre (0)	Diâmetro (mm)	linfonodos positivos	T	N	M	TNM	Sobrevivência (meses)	Status vivo (1) obito (0)
1	M	16	P	0	20	0	1	0	0	I-a	92	1
2	F	22	C	0	55	0	2	0	0	I-b	102	1
3	M	65	P	0	8	2	1	2	0	III-a	94	1
4	M	54	C	0	20	0	1	0	0	I-a	99	1
5	M	30	C	0	20	0	2	0	0	I-b	99	1
6	M	19	C	0	60	0	2	0	0	I-b	94	1
7	M	29	C	0	22	0	1	0	0	I-a	96	1
8	F	50	C	0	15	0	2	0	0	I-b	99	1
9	M	70	P	0	15	0	1	0	0	I-a	85	1
10	M	30	C	0	20	2	3	1	0	III-a	84	1
11	M	47	C	0	15	0	1	0	0	I-a	82	1
12	M	50	C	0	20	0	2	0	0	I-b	90	1
13	F	51	C	0	5	0	1	0	0	I-a	80	1
14	M	68	P	0	25	0	1	0	0	I-a	72	1
15	F	47	C	0	60	2	2	1	0	II-b	74	1
16	M	27	C	0	25	0	1	0	0	I-a	72	1
17	F	17	C	0	16	0	2	0	0	I-b	70	1
18	F	66	P	0	7	0	1	0	0	I-a	63	1
19	F	42	C	1	35	0	2	0	0	I-b	57	1
20	F	52	C	0	60	0	2	0	0	I-b	58	1
21	M	34	C	0	25	0	1	0	0	I-a	64	1
22	M	72	P	0	30	0	2	0	0	I-b	66	1
23	M	52	C	0	10	0	1	0	0	I-a	163	1
24	F	24	P	0	50	0	2	0	0	I-b	102	1
25	F	79	P	0	6	0	1	0	0	I-a	167	1
26	F	28	C	0	25	0	1	0	0	I-a	163	1
27	M	61	C	0	70	0	2	0	1	IV	166	0
28	F	36	C	0	6	0	1	0	0	I-a	158	1
29	F	64	C	0	40	0	2	0	0	I-b	153	1
30	F	57	C	0	25	0	1	0	0	I-a	112	1
31	F	74	P	0	20	1	1	1	0	II-a	153	1
32	F	29	P	0	8	0	1	0	0	I-a	153	1
33	M	55	C	0	30	1	2	2	0	III-a	152	0
34	F	57	P	0	20	0	1	0	0	I-a	151	1
35	F	36	P	0	25	1	1	1	0	II-a	84	1
36	F	29	P	0	30	0	2	0	0	I-b	147	1
37	F	45	C	0	10	0	1	0	0	I-a	147	1
38	M	71	C	0	10	0	2	0	0	I-b	150	0
39	M	68	P	0	10	0	1	0	0	I-a	141	1
40	M	43	P	0	15	1	1	2	0	III-a	124	1
41	F	69	P	0	15	0	1	0	0	I-a	147	1

Continua...

n. paciente	Gênero Masculino(M) Feminino (F)	Idade (anos)	Localizacao central (C) periférica (P)	Margem comprometida (1) livre (0)	Diâmetro (mm)	linfonodos positivos	T	N	M	TNM	Sobrevivência (meses)	Status vivo (1) obito (0)
42	F	19	C	0	18	0	2	0	1	IV	150	1
43	M	63	P	0	35	1	2	2	0	III-a	14	0
44	F	58	P	0	11	0	1	0	0	I-a	147	1
45	M	34	C	0	15	0	2	0	0	I-b	131	1
46	F	54	P	0	20	0	1	0	0	I-a	127	1
47	F	56	C	0	12	0	1	0	0	I-a	133	1
48	F	50	P	0	15	0	1	0	1	IV	28	0
49	F	38	C	0	20	0	1	0	0	I-a	136	1
50	M	27	C	0	35	0	2	0	0	I-b	132	1
51	M	71	C	0	12	0	1	0	0	I-a	133	1
52	F	36	C	0	10	0	1	0	0	I-a	126	1
53	F	1	C	0	40	0	2	0	0	I-b	115	1
54	F	42	C	0	30	0	2	0	0	I-b	120	1
55	F	52	C	0	25	0	1	0	0	I-a	125	1
56	F	41	C	0	25	0	2	0	0	I-b	121	1
57	F	23	C	0	15	0	2	0	0	I-b	117	1
58	M	44	C	0	20	4	2	2	1	IV	81	0
59	M	40	C	0	25	0	2	0	0	I-b	111	1
60	F	42	C	0	20	0	3	0	0	II-b	108	1
61	F	64	P	0	4	0	0	0	0	0	125	1
62	F	76	C	0	20	0	1	0	0	I-a	135	1
63	M	37	C	0	30	0	2	0	0	I-b	275	1
64	F	45	C	0	25	0	2	0	0	I-b	276	1
65	F	28	C	0	50	0	2	0	0	I-b	271	1
66	F	43	P	0	35	2	2	2	0	III-a	280	1
67	F	49	C	0	35	1	2	1	0	II-a	279	1
68	F	54	C	0	20	0	2	0	0	I-b	279	1
69	F	31	C	0	35	0	2	0	0	I-b	259	1
70	M	58	C	0	15	0	1	0	0	I-a	269	1
71	F	34	C	0	30	0	2	0	0	I-b	266	1
72	M	65	C	0	6	0	1	0	0	I-a	263	1
73	F	45	C	0	15	0	1	0	0	I-a	265	1
74	M	44	C	0	13	0	1	0	0	I-a	267	1
75	M	43	P	0	10	0	1	0	0	I-a	261	1
76	F	39	C	0	15	0	1	0	0	I-a	248	1
77	F	52	C	0	35	2	2	2	0	III-a	252	1
78	F	36	C	0	10	0	1	0	0	I-a	247	1
79	M	75	P	0	30	0	2	0	0	I-b	256	1
80	M	60	C	0	30	0	2	0	0	I-b	248	1
81	M	30	C	0	10	0	1	0	0	I-a	257	1
82	M	74	P	0	15	0	1	0	0	I-a	100	0
83	M	27	C	0	25	0	1	0	0	I-a	235	1

Continua...

n. paciente	Gênero Masculino(M) Feminino(F)	Idade (anos)	Localizacao central (C) periférica (P)	Margem comprometida (1) livre (0)	Diâmetro (mm)	linfonodos positivos	T	N	M	TNM	Sobrevivência (meses)	Status vivo (1) obito (0)
84	F	35	P	0	10	0	1	0	0	I-a	240	1
85	F	24	C	0	25	0	2	0	0	I-b	243	1
86	M	76	C	0	70	0	2	0	0	I-b	225	1
87	F	72	C	0	40	0	2	0	0	I-b	224	1
88	F	43	C	0	20	0	2	0	0	I-b	233	1
89	M	75	P	0	30	0	2	0	0	I-b	213	1
90	F	51	C	0	20	0	1	0	0	I-a	222	1
91	M	47	C	0	7	0	1	0	0	I-a	205	1
92	F	77	P	0	40	0	2	0	1	IV	68	0
93	F	32	C	0	15	0	2	0	0	I-b	206	1
94	F	67	P	0	30	0	2	0	0	I-b	190	1
95	M	53	P	0	20	1	1	1	0	II-a	121	0
96	M	46	C	0	15	0	2	0	0	I-b	189	1
97	F	53	P	0	30	0	2	0	0	I-b	188	1
98	F	45	C	0	40	0	2	0	0	I-b	195	1
99	F	42	P	0	10	0	1	0	0	I-a	197	1
100	F	73	C	0	30	0	3	0	1	IV	4	0
101	F	44	C	0	15	0	1	0	0	I-a	181	1
102	M	72	C	0	60	0	2	0	0	I-b	39	0
103	M	57	C	0	30	0	2	0	0	I-b	141	0
104	F	70	C	0	60	0	2	0	1	IV	36	0
105	F	61	C	0	60	0	2	0	1	IV	69	1
106	M	60	C	0	55	0	2	0	0	I-b	270	1
107	M	59	P	0	20	0	1	0	0	I-a	62	1
108	F	67	P	0	5	0	1	0	0	I-a	61	1
109	F	29	C	0	30	0	1	0	0	I-a	61	1
110	M	70	P	0	30	0	2	0	0	I-b	317	1
111	M	34	C	0	20	0	1	0	0	I-a	316	1
112	F	19	C	0	15	0	1	0	0	I-a	228	1
113	M	45	C	0	20	0	3	0	0	II-b	220	1
114	F	18	C	0	30	1	3	1	0	III-a	1	0
115	F	41	P	0	18	0	1	0	0	I-a	284	1
116	F	25	C	0	20	0	1	0	0	I-a	275	1
117	M	62	C	0	30	0	2	0	0	I-b	228	0
118	F	39	C	0	35	0	2	0	0	I-b	262	1
119	F	29	C	0	20	0	1	0	0	I-a	261	1
120	F	43	C	0	20	0	1	0	0	I-a	257	1
121	M	56	P	0	30	0	2	0	0	I-b	243	1
122	F	38	C	0	15	0	1	0	0	I-a	240	1
123	M	17	C	0	18	0	2	0	0	I-b	236	1
124	M	42	C	0	40	2	1	2	0	III-a	229	1
125	F	42	C	1	20	0	1	0	1	IV	212	1

Continua...

n. paciente	Gênero Masculino(M) Feminino(F)	Idade (anos)	Localizacao central (C) periférica (P)	Margem comprometida (1) livre (0)	Diâmetro (mm)	linfonodos positivos	T	N	M	TNM	Sobrevivência (meses)	Status vivo (1) obito (0)
126	F	27	C	0	35	0	2	0	0	I-b	208	1
127	F	46	C	0	50	0	2	0	0	I-b	208	1
128	M	51	C	0	70	3	3	2	1	IV	11	0
129	F	62	C	0	70	0	3	0	0	II-b	204	1
130	M	67	P	0	40	0	2	0	1	IV	3	0
131	M	53	C	1	45	0	2	0	1	IV	200	1
132	F	30	C	0	40	0	2	0	0	I-b	198	1
133	M	37	C	1	9	0	1	0	0	I-a	195	1
134	F	57	C	0	9	0	1	0	0	I-a	192	1
135	F	58	P	0	45	0	2	0	0	I-b	187	1
136	M	63	C	0	40	0	2	0	0	I-b	186	1
137	F	27	C	1	20	0	1	0	0	I-a	185	1
138	M	64	C	1	20	0	1	0	0	I-a	184	1
139	F	33	C	0	20	0	1	0	0	I-a	180	1
140	F	9	C	1	30	0	2	0	0	I-b	178	1
141	F	69	P	0	5	2	1	2	0	III-a	176	1
142	F	14	C	0	50	0	2	0	0	I-b	175	1
143	F	24	C	0	25	2	1	1	0	III-a	170	1
144	M	66	C	0	70	3	2	1	0	III-a	162	1
145	M	66	C	0	60	0	2	0	0	I-b	150	1
146	F	20	C	0	30	0	2	0	0	I-b	146	1
147	F	49	C	0	30	0	2	0	0	I-b	139	1
148	F	28	C	0	40	0	3	0	0	II-b	60	0
149	M	29	C	0	10	0	1	0	0	I-a	140	1
150	F	42	C	0	20	0	3	0	0	II-b	138	1
151	F	32	C	0	42	0	3	0	0	II-b	264	1
152	F	37	C	0	45	0	2	0	0	I-b	187	1
153	F	54	C	0	65	0	3	0	0	II-b	133	1
154	M	37	P	0	30	0	1	0	0	I-a	127	1
155	F	30	C	0	15	0	1	0	0	I-a	125	1
156	M	32	C	1	10	1	1	1	0	II-a	123	1
157	M	20	C	0	17	0	1	0	0	I-a	117	1
158	M	29	P	0	20	0	1	0	0	I-a	112	1
159	F	35	C	1	15	0	1	0	0	I-a	100	1
160	M	77	C	0	40	0	2	0	0	I-b	100	1
161	M	45	C	0	30	1	2	1	0	III-a	100	1
162	M	46	C	1	20	2	3	1	1	IV	108	0
163	M	48	C	0	5	0	1	0	0	I-a	76	1
164	F	24	C	0	10	0	3	0	0	II-b	64	1
165	F	24	P	0	35	0	2	0	0	I-b	60	1
166	M	47	P	0	7	0	1	0	0	I-a	60	1

Continua...

n. paciente	Gênero		Idade (anos)	Localizacao central (C) periférica (P)	Margem comprometida (1) livre (0)	Diâmetro (mm)	linfonodos positivos	T	N	M	TNM	Sobrevivência (meses)	Status vivo (1) obito (0)
	Masculino(M)	Feminino (F)											
167	F		83	P	0	13	0	1	0	0	I-a	62	1
168	M		70	C	1	25	0	2	0	0	I-b	64	1
169	M		46	C	0	15	0	2	0	0	I-b	66	1
170	F		32	P	0	35	0	2	0	0	I-b	70	1
171	M		42	C	0	30	0	2	0	0	I-b	72	1
172	F		20	C	0	20	0	3	0	0	II-b	80	1
173	F		49	C	1	15	3	1	3	0	III-b	85	1
174	M		69	P	1	30	0	1	0	1	IV	66	1
175	F		36	C	0	18	0	1	0	0	I-a	88	1
176	M		23	C	0	12	0	1	0	0	I-a	78	1
177	F		64	C	0	20	0	1	0	0	I-a	60	1
178	F		33	C	0	18	0	1	0	0	I-a	66	1
179	F		29	C	0	30	0	2	0	0	I-b	68	1
180	F		51	C	1	65	0	2	0	0	I-b	80	1
181	F		46	C	0	20	0	2	0	0	I-b	82	1
182	F		77	P	0	5	0	1	0	0	I-a	92	1

Apêndice 2 – Tabela 3: Regressão logística para prever o “M” operatório

Variáveis na equação		β	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(β)	95% C.I. para Exp(β) Inferior	Superior
Etapa 1	SEXO(1)	.032	.576	.003	1	.955	1.033	.334	3.196
	IDADE	.024	.018	1.784	1	.182	1.024	.989	1.061
	CENTRAL x PERIF (1)	.360	.668	.291	1	.590	1.434	.387	5.313
	DIAMETRO	.044	.016	7.203	1	.007	1.045	1.012	1.079
	N OPERATORIO			.862	3	.835			
	N OPERATORIO (1)	-.223	1.158	.037	1	.848	.800	.083	7.742
	N OPERATORIO (2)	.792	.903	.768	1	.381	2.207	.376	12.961
	N OPERATORIO (3)	-2.976	22.247	.018	1	.894	.051	.000	44100841 92653361 00.000
Constant	-5.063	1.030	24.163	1	.000	.006			
Etapa 2	IDADE	.024	.018	1.924	1	.165	1.025	.990	1.060
	CENTPERI(1)	.359	.668	.289	1	.591	1.432	.387	5.309
	DIAMETRO	.044	.016	7.219	1	.007	1.045	1.012	1.079
	NOPERAT			.904	3	.824			
	NOPERAT(1)	-.221	1.157	.036	1	.849	.802	.083	7.741
	NOPERAT(2)	.800	.889	.811	1	.368	2.227	.390	12.711
	NOPERAT(3)	-2.989	22.246	.018	1	.893	.050	.000	43426763 31902458 00.000
	Constant	-5.062	1.030	24.136	1	.000	.006		
Etapa 3	IDADE	.024	.017	1.910	1	.167	1.024	.990	1.059
	CENTPERI(1)	.428	.660	.421	1	.517	1.534	.421	5.591
	DIAMETRO	.045	.016	7.651	1	.006	1.046	1.013	1.079
	Constant	-5.027	1.008	24.861	1	.000	.007		
Etapa 4	IDADE	.027	.017	2.726	1	.099	1.028	.995	1.062
	DIAMETRO	.041	.015	7.610	1	.006	1.042	1.012	1.072
	Constant	-4.951	.994	24.818	1	.000	.007		

Apêndice 3 – Tabela 4: Regressão logística para prever o “NM” conjunto

	Variáveis na equação	β	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(β)	95.0% C.I. for EXP(β)	
								Inferior	Superior
Etapa 1	SEXO(1)	.314	.396	.628	1	.428	1.369	.629	2.978
	IDADE	.010	.012	.707	1	.400	1.010	.987	1.034
	CENTPERI(1)	.701	.448	2.448	1	.118	2.016	.838	4.850
	DIAMETRO	.034	.012	8.103	1	.004	1.035	1.011	1.060
	Constant	-3.209	.661	23.554	1	.000	.040		
Etapa 2	IDADE	.012	.012	1.053	1	.305	1.012	.989	1.036
	CENTPERI(1)	.696	.448	2.409	1	.121	2.006	.833	4.832
	DIAMETRO	.034	.012	8.187	1	.004	1.035	1.011	1.060
	Constant	-3.163	.658	23.111	1	.000	.042		
Etapa 3	CENTPERI(1)	.849	.422	4.042	1	.044	2.337	1.022	5.348
	DIAMETRO	.037	.012	9.430	1	.002	1.037	1.013	1.062
	Constant	-2.700	.465	33.695	1	.000	.067		

Apêndice 4 – Tabela 5: P_{tumor}

n	Contagem de cels tumorais										P_{tumor}
	Campos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	91	80	100	100	100	100	100	100	100	100	971
3	100	100	100	100	100	100	100	100	93	100	993
4	100	100	100	100	90	100	96	85	100	100	971
5	100	100	100	90	100	80	100	100	100	100	970
6	100	100	100	96	100	100	93	100	100	100	989
7	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100	992
8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
9	100	100	90	100	80	100	100	100	100	100	970
10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
11	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
12	100	90	86	100	80	100	100	100	100	100	956
14	100	100	100	100	95	100	100	91	100	100	986
15	100	100	100	95	100	100	100	100	100	100	995
16	100	100	100	99	95	100	100	100	90	100	984
17	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
18	100	100	100	100	96	100	100	90	100	86	972
19	100	96	100	100	90	100	100	100	100	100	986
20	100	100	100	100	100	100	90	100	100	96	986
21	100	96	87	100	100	100	86	100	100	90	959
22	100	100	100	100	80	85	100	90	100	100	955
23	100	100	96	100	100	100	100	100	90	100	986
24	80	100	95	100	100	100	100	100	100	100	975
26	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
27	100	86	100	100	100	100	100	100	100	100	986
28	100	100	100	100	90	100	90	100	100	100	980
29	100	100	95	100	100	100	100	100	100	90	985
30	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	990
31	100	100	100	100	100	100	100	100	96	100	996
33	100	100	80	100	96	100	100	100	100	96	972
34	100	100	100	100	95	100	91	86	90	97	959
35	96	86	90	100	96	100	100	100	100	100	968
36	100	100	90	100	100	90	100	90	100	100	970
37	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
38	80	100	95	100	86	100	100	91	100	100	952
39	100	100	100	90	90	100	84	100	100	100	964
40	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	980
41	96	85	100	90	100	96	100	100	100	95	962
42	100	100	100	100	100	100	90	86	100	90	966
43	96	100	99	100	96	80	100	100	100	100	971
44	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
45	80	86	100	100	100	100	100	100	100	100	966
46	100	100	90	85	100	96	100	100	100	98	969
47	100	90	100	90	100	100	100	100	100	100	980

Continua...

n	Contagem de cels tumorais										P _{tumor}
	Campos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
48	100	100	90	100	90	100	100	100	100	100	980
49	100	100	100	100	100	100	100	100	90	100	990
50	100	100	96	100	98	100	100	90	100	100	984
51	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
52	100	100	100	100	100	100	100	90	100	100	990
53	80	90	100	100	100	100	100	100	100	100	970
54	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	990
55	89	100	91	100	100	100	97	100	100	100	977
56	100	100	90	100	87	100	100	100	95	100	972
57	100	100	100	100	95	100	100	100	100	100	995
59	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
60	100	87	100	100	100	100	90	100	94	100	971
62	100	100	96	100	98	89	100	90	100	100	973
63	100	100	96	100	100	91	100	100	100	100	987
65	100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	980
66	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100	995
67	100	100	100	100	100	100	100	100	93	100	993
68	88	100	91	100	100	100	99	100	100	100	978
69	100	100	100	100	100	80	100	95	100	100	975
71	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
72	100	93	100	100	100	100	100	100	100	100	993
73	100	86	100	100	100	100	100	96	100	100	982
74	100	100	100	95	100	100	96	100	100	100	991
76	100	100	90	100	100	100	96	100	100	100	986
77	98	100	100	80	100	100	96	100	100	100	974
78	100	100	95	100	100	100	100	100	80	100	975
79	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
81	90	100	100	100	100	96	100	100	100	100	986
82	100	100	100	99	100	97	100	100	100	100	996
83	100	96	90	100	100	86	95	100	100	100	967
85	100	100	90	95	100	100	100	93	100	100	978
86	100	80	100	97	100	100	100	100	90	100	967
87	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	990
88	100	80	100	90	100	80	100	100	100	100	950
91	86	100	90	90	100	85	100	100	100	100	951
92	100	96	100	100	100	95	100	100	100	95	986
94	100	100	100	100	87	90	100	100	100	100	977
95	100	90	100	100	80	96	87	85	100	100	938
96	90	100	100	99	100	100	100	100	80	100	969
97	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
98	100	100	100	95	100	100	96	89	100	100	980
99	100	100	100	100	93	100	100	100	100	100	993
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000
101	95	93	100	100	95	100	100	100	100	100	983
102	100	100	100	100	95	100	100	100	100	93	988

Continua...

n	Contagem de cels tumorais										P _{tumor}
	Campos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
103	100	96	95	100	100	100	100	100	100	100	991
104	100	100	100	96	100	100	100	99	100	100	995
105	100	100	100	100	100	96	100	90	100	100	986
107	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	980
108	100	100	100	100	90	91	100	100	100	100	981
109	100	100	100	100	100	100	100	80	95	100	975
110	100	100	100	100	100	100	100	100	87	100	987

Apêndice 5 – Tabela 6: P_{tumor} , P_i e IPI

n	Contagem LYVE - 1 - Vasos										P_{tumor}	P_i	IPI
	Campos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
2	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	971	5	5.149330587
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	993	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	971	1	1.029866117
5	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	970	3	3.092783505
6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	989	1	1.011122346
7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	992	1	1.008064516
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1000	0	0
9	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	970	2	2.06185567
10	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1000	2	2
11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1000	1	1
12	0	1	2	0	0	2	0	0	0	0	956	5	5.230125523
14	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	986	1	1.014198783
15	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	995	3	3.015075377
16	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	984	3	3.048780488
17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1000	1	1
18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	972	1	1.028806584
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	986	0	0
20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	986	1	1.014198783
21	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	959	3	3.128258603
22	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	955	2	2.094240838
23	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	986	2	2.028397566
24	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	975	2	2.051282051
26	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1000	1	1
27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	986	1	1.014198783
28	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	980	1	1.020408163
29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	985	1	1.015228426
30	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	990	2	2.02020202
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	996	0	0
33	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	972	3	3.086419753
34	0	0	0	0	2	0	0	2	1	1	959	6	6.256517205
35	0	1	0	0	1	2	0	1	0	0	968	5	5.165289256
36	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	970	1	1.030927835
37	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1000	2	2
38	1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	952	5	5.25210084
39	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0	964	5	5.186721992
40	1	0	0	0	3	0	2	1	1	0	980	8	8.163265306
41	2	3	0	1	0	0	1	0	1	0	962	8	8.316008316
42	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	966	3	3.105590062
43	1	0	0	0	0	3	1	0	0	0	971	5	5.149330587
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1000	0	0
45	1	2	0	0	0	0	0	0	2	1	966	6	6.211180124
46	1	1	4	1	1	2	0	2	0	1	969	13	13.41589267
47	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	980	3	3.06122449

Continua...

n	Contagem LYVE - 1 - Vasos										P _{tumor}	P _i	IPI
	Campos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	980	2	2.040816327
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	990	0	0
50	1	0	0	0	2	0	0	2	0	0	984	5	5.081300813
51	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1000	2	2
52	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	990	3	3.03030303
53	1	0	2	1	0	0	0	0	0	1	970	5	5.154639175
54	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	990	2	2.02020202
55	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	977	2	2.047082907
56	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	972	2	2.057613169
57	1	0	0	0	0	2	0	0	1	3	995	7	7.035175879
59	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1000	2	2
60	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0	971	5	5.149330587
62	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	973	5	5.138746146
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	987	0	0
65	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	980	1	1.020408163
66	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	995	2	2.010050251
67	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	993	1	1.007049345
68	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	978	5	5.112474438
69	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	975	1	1.025641026
71	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1000	2	2
72	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	993	4	4.028197382
73	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	982	2	2.036659878
74	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	991	2	2.018163471
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	986	0	0
77	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	974	3	3.080082136
78	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	975	3	3.076923077
79	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1000	2	2
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1000	1	1
81	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	986	3	3.042596349
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	996	0	0
83	0	1	3	0	0	2	1	0	0	1	967	8	8.273009307
85	1	0	2	1	0	1	0	0	2	0	978	7	7.157464213
86	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	967	3	3.10237849
87	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	990	1	1.01010101
88	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	950	3	3.157894737
91	3	0	1	1	2	0	2	0	0	1	951	10	10.51524711
92	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	986	2	2.028397566
94	0	0	1	0	2	2	0	0	0	1	977	6	6.141248721
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	938	1	1.066098081
96	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	969	4	4.127966976
97	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1000	2	2
98	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	980	2	2.040816327
99	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	993	2	2.014098691
100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1000	1	1
101	1	1	0	1	2	0	0	1	1	0	983	7	7.121057986
102	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	988	3	3.036437247

Continua...

n	Contagem LYVE-1 - Vasos										P _{tumor}	P _i	IPI
	Campos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
103	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	991	2	2.018163471
104	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	995	2	2.010050251
105	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	986	2	2.028397566
107	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	980	2	2.040816327
108	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	981	1	1.019367992
109	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	975	3	3.076923077
110	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	987	1	1.013171226