

Daniel Messias de Moraes Neto

**Predição do risco individual de
micrometástase do tumor carcinóide típico
broncopulmonar em função de variáveis
clínicas, anatomopatológicas e
biomarcadores teciduais**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Dr. João Carlos das Neves Pereira

SÃO PAULO
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes-Neto, Daniel Messias de

Predição do risco individual de micrometástase do tumor carcinóide típico
broncopulmonar em função de variáveis clínicas, anátomo-patológicas e
biomarcadores teciduais / Daniel Messias de Moraes-Neto. -- São Paulo, 2010.

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: João Carlos das Neves Pereira.

**Descritores: 1.Tumor carcinóide/classificação 2.Tumores
neuroendócrinos/classificação 3.Metástase neoplásica/patologia
4.Micrometástase/patologia**

Dedico este trabalho a meus avós Sebastiana e Daniel, à minha esposa Anna Rita e meu filho Rafael.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus pais pelo dom da vida.

À minha família, tia Verinha, Maria Helena, tios Homero, Humberto e Uiles e aos queridos padrinho Francisco e madrinha Célia a oportunidade de convivência e aprendizado da importância dos valores familiares.

À minha esposa Anna Rita e meu filho Rafael a compreensão pelos meus momentos de ausência física devido ao trabalho, sempre com pensamentos e atitudes de amor e carinho mesmo nos momentos mais difíceis de nossas vidas.

Ao Dr. João Carlos das Neves Pereira pela possibilidade de trabalhar ao seu lado nestes anos, desde a residência até a pós-graduação, inicialmente sendo o meu guru e posteriormente também o meu orientador, sem o qual não seria possível a realização deste projeto tão importante em minha vida. Obrigado meu grande amigo João Carlos pelo convívio e por ser esta pessoa genial em todos os sentidos, além de possuir um coração do tamanho do universo, que jamais mediu esforços para ajudar a quem quer que fosse, inclusive a esta pessoa que o agradece e admira fervorosamente.

Ao Prof. Dr. José Ribas Milanez de Campos, pessoa que aprendi a admirar logo no início de nossa relação de amizade. Também outra pessoa com o coração enorme, que me aceitou como pós-graduando mesmo não sendo o responsável pela linha de pesquisa à qual me liguei. Mas para me ajudar, me apoiou incondicionalmente. Obrigado mais uma vez Dr. Ribas, pela generosidade e pelo apoio.

Ao grande amigo e mentor Prof. Dr. Luis Antônio Brasil pelo estímulo inicial nos anos de faculdade, até o momento em que pude ter a honra de ser seu colega e parceiro na docência e poder compartilhar do seu convívio em tantas cirurgias.

À Dra. Yara Ximenes e Dra. Luciana Ximenes e Dr. Élbio Cândido de Paula, patologistas de imensa importância e generosidade em nossa sociedade, pela possibilidade de utilizar o seu laboratório para a confecção de várias etapas deste trabalho e pela orientação em relação às micrometástases.

À Dra. Larissa Marinho e Dra. Érika Ximenes, pessoas incansáveis que auxiliaram e avaliaram as lâminas confeccionadas, além de ter a enorme paciência em me orientar em relação aos achados imuno-histoquímicos.

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi e Dr. Edwin Roger Parra Cuentas que me possibilitaram discussões importantes acerca do assunto tratado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene por incentivar a continuidade do meu aprendizado após o término de minha residência médica neste serviço.

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo-Fernandes também por me incentivar desde o princípio a buscar o conhecimento como forma de crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Pinho Moreira, incansável em sua batalha à frente do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular do Instituto do Coração, com quem aprendi temas de grande importância na área da Bioestatística, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos grandes mestres Dr. Ricardo Beyruti, Dr. Luis Miguel Melero Sancho, Dr. Ângelo Fernandes e Dr. Hélio Minamoto pela oportunidade de aprendizado intenso durante e após a residência médica.

Aos colegas Dr. Ricardo Mingarini Terra, Dr. Augusto Ishi e Dr. Júlio Benevides e Dra Andréa Day pelos momentos prazerosos de convívio e grande amizade durante e após a residência médica, tendo podido compartilhar com todos a possibilidade de sermos colegas também na pós-graduação.

À Eva Malheiros de Oliveira, Juliana Lattari Sobrinho e Neusa Rodrigues Dini, da secretaria de pós-graduação pela atenção e carinho que sempre foram dispensados a mim.

Aos amigos Aristides Tadeu Correia, Eliana Ogata e Rosângela Monteiro pela amizade e pelas dicas em relação ao projeto inicial deste trabalho.

“ Por que não basta ter o espírito bom, o principal é aplicá-lo bem.”

René Descartes

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

SUMÁRIO

Lista de Siglas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Espectro das lesões neuroendócrinas.....	8
2.1.1 Hiperplasia de células neuroendócrinas.....	8
2.1.2 “Tumorlets”.....	9
2.1.3 Carcinóides.....	10
2.2 Classificação dos tumores neuroendócrinos broncopulmonares.....	11
2.2.1 Histórico da classificação.....	11
2.2.2 Classificação atual.....	12
2.3 Apresentação clínica.....	14
2.4 Tratamento.....	16
2.4.1 Cirurgia.....	16
2.4.2 Quimioterapia.....	16
2.4.3 Radioterapia.....	17
2.5 Metástases.....	18
2.5.1 Macrometástases.....	18
2.5.2 Micrometástases e células tumorais isoladas.....	18
2.6 Embriologia.....	21
2.6.1 A teoria centrífuga ou independente.....	22
2.6.2 A teoria centrípeta ou conjunta.....	22
2.7 Anatomia.....	22
2.8 Histologia.....	24
2.9 Fisiologia.....	24
2.10 Micrometástase em tumores carcinóides.....	25
3. OBJETIVOS.....	29

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
4.1 Casuística.....	32
4.2 Métodos.....	35
4.2.1 Confirmação do diagnóstico histológico.....	35
4.2.2 Coleta de dados clínicos, epidemiológicos e anatomopatológicos.....	36
4.2.3 Imuno-histoquímica.....	37
4.2.3.1 Técnicas de coloração.....	37
4.2.3.1.1 Técnica imuno-histoquímica empregada na detecção dos antígenos Sinaptosina e Cromogranina A.....	37
4.2.3.2 Determinação da presença de micrometástases linfáticas.....	41
4.2.4 Organização dos dados.....	42
4.2.5 Análise estatística.....	42
4.2.6 Índice de risco para a ocorrência de micrometástase.....	44
4.2.6.1 Índice de risco com base na análise multivariada	44
4.2.6.2 Proposta de um modelo simplificado para índice de risco	45
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Análise descritiva dos dados epidemiológicos, anatomopatológicos, cirúrgicos e biomarcadores da casuística geral.....	49
5.1.1 Teste de parametricidade.....	49
5.1.2 Dados demográficos da casuística geral – análise descritiva.....	50
5.1.2.1 Gênero.....	50
5.1.2.2 Idade.....	51
5.1.3 Dados anatomopatológicos – análise descritiva.....	52
5.1.3.1 Lobo acometido pelo tumor.....	52
5.1.3.2 Localização central ou periférica do tumor.....	54
5.1.3.3 Diâmetro do maior eixo na casuística geral.....	55
5.1.3.4 Estadiamento T.....	56
5.1.4 Dados cirúrgicos – análise descritiva.....	56
5.1.4.1 Ressecção pulmonar realizada.....	56
5.1.4.2 Margem cirúrgica acometida por tumor.....	57
5.1.4.3 Quantidade de linfonodos ressecados por paciente.....	58

5.1.4.4 Quantidade de linfonodos acometidos por macrometástase por paciente.....	59
5.1.5 Biomarcadores – análise descritiva.....	60
5.1.5.1 Sinaptofisina ou Cromogranina A.....	60
5.1.5.2 Sinaptofisina.....	61
5.1.5.3 Cromogranina A.....	62
5.1.5.4 Sincronia de Sinaptofisina e Cromogranina A (dupla marcação).....	63
5.2 Dados referentes à ocorrência de macrometástases e micrometástases linfáticas e hematogênicas.....	63
5.2.1 Acometimento por macrometástase ou micrometástase linfática.....	63
5.2.2 Acometimento por macrometástase linfática.....	64
5.2.3 Acometimento por micrometástase linfática.....	64
5.2.4 Acometimento concomitante de micrometástase e macrometástase.....	64
5.2.5 Ocorrência de metástase hematogênica durante acompanhamento pós-operatório.....	65
5.3 Óbitos.....	66
5.4 Análise univariada.....	67
5.4.1 Comparação entre grupos sem e com macrometástase....	68
5.4.1.1 Idade.....	68
5.4.1.2 Gênero.....	69
5.4.1.3 Localização central ou periférica do tumor.....	70
5.4.1.4 Diâmetro do maior eixo do tumor.....	71
5.4.1.5 Margem cirúrgica acometida por tumor.....	72
5.4.1.6 Presença de micrometástase.....	73
5.4.1.7 Metástase hematogênica.....	74
5.4.1.8 Resumo das análises dos grupos sem e com macrometástase.....	76
5.4.2 Comparação entre grupos sem e com macrometástase / grupo de células tumorais.....	77
5.4.2.1 Idade.....	77
5.4.2.2 Gênero.....	78
5.4.2.3 Localização central ou periférica do tumor.....	79
5.4.2.4 Maior diâmetro do tumor.....	80
5.4.2.5 Margem cirúrgica comprometida.....	81
5.4.2.6 Presença de micrometástase.....	82
5.4.2.7 Metástase hematogênica.....	83

5.4.2.8	Resumo das análises dos grupos sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais.....	84
5.4.3	Comparação entre grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática (macrometástase, grupo de células tumorais e células tumorais isoladas).....	85
5.4.3.1	Idade.....	85
5.4.3.2	Gênero.....	86
5.4.3.3	Localização central ou periférica.....	87
5.4.3.4	Diâmetro do maior eixo do tumor.....	88
5.4.3.5	Margem cirúrgica comprometida pelo tumor.....	89
5.4.3.6	Metástase hematogênica.....	89
5.4.3.7	Resumo das análises dos grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática.....	90
5.4.4	Comparação entre grupos sem e com qualquer tipo de micrometástase linfática (grupo de células tumorais e células tumorais isoladas).....	91
5.4.4.1	Idade.....	91
5.4.4.2	Gênero.....	92
5.4.4.3	Localização central ou periférica.....	93
5.4.4.4	Diâmetro do maior eixo do tumor.....	94
5.4.4.5	Margem cirúrgica comprometida.....	95
5.4.4.6	Metástase hematogênica.....	96
5.4.4.7	Resumo das análises dos grupos sem e com qualquer tipo de micrometástase linfática.....	97
6.	DISCUSSÃO.....	99
6.1	Limitações do método.....	99
6.1.1	Limitações do desenho do estudo.....	99
6.1.2	Limitações do tamanho da amostra.....	100
6.1.3	Limitações por viés de seleção.....	101
6.1.4	Limitações da definição da entidade nosológica.....	102
6.1.5	Limitações do estudo biomolecular.....	102
6.2	Discussão dos resultados da análise descritiva dos dados demográficos, anatomopatológicos, cirúrgicos e biomarcadores da casuística geral.....	104
6.2.1	Gênero.....	104
6.2.2	Idade.....	106
6.2.3	Lobo acometido pelo tumor.....	107
6.2.4	Localização central ou periférica do tumor.....	107

6.2.5	Diâmetro do maior eixo do tumor.....	108
6.2.6	Ressecção pulmonar realizada.....	109
6.2.7	Margem cirúrgica acometida pelo tumor.....	110
6.2.8	Quantidade de linfonodos ressecados por paciente.....	111
6.2.9	Análise dos biomarcadores Sinaptofisina e Cromogranina A.....	112
6.2.10	Macrometástase linfática.....	114
6.2.11	Óbitos.....	116
6.3	Análise univariada.....	116
6.3.1	Análise dos resultados da comparação entre grupos sem e com macrometástase.....	118
6.3.1.1	Idade.....	118
6.3.1.2	Gênero.....	118
6.3.1.3	Localização central ou periférica do tumor.....	119
6.3.1.4	Diâmetro do maior eixo do tumor.....	120
6.3.1.5	Margem cirúrgica acometida pelo tumor.....	120
6.3.1.6	Presença de micrometástase.....	121
6.3.1.7	Metástase hematogênica.....	122
6.3.2	Análise dos resultados da comparação entre grupos sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais.....	123
6.3.3	Análise dos resultados da comparação entre grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática (macrometástase, grupo de células e células tumorais isoladas).....	124
6.3.4	Análise dos resultados da comparação entre grupos sem e com micrometástase.....	125
6.3.4.1	Idade.....	125
6.3.4.2	Gênero.....	126
6.3.4.3	Localização central ou periférica.....	127
6.3.4.4	Diâmetro do maior eixo do tumor.....	128
6.3.4.5	Margem cirúrgica comprometida.....	128
6.3.4.6	Metástase hematogênica.....	129
6.3.4.7	Conclusão.....	130
6.4	Análise multivariada.....	130
6.5	Perspectivas.....	131
7.	CONCLUSÕES.....	134

8. ANEXOS.....	136
8.1 ANEXO A.....	136
8.2 ANEXO B.....	137
8.3 ANEXO C.....	138
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

LISTA DE SIGLAS

% - porcentagem

BINTER – brônquio intermédio

BPD – brônquio principal direito

BPE – brônquio principal esquerdo

BSA – soro de albumina bovina

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CGA – campo de grande aumento

CTI – células tumorais isoladas

DAB - 3-3'-diaminobenzamida

et al – e outros

GCT – grupo de células tumorais (“cluster”)

LID – lobo inferior direito

LIE – lobo inferior esquerdo

LM – lobo médio

LSAB-HRP - Large Streptavidin-Avidin-Biotin – System Peroxidase

LSD – lobo superior direito

LSE – lobo superior esquerdo

µL – microlitro

µm – micrômetro

mg – miligrama

mm – milímetro

mm² – milímetro quadrado

mM – milimolar

odds ratio – razão de chances

PBS – tampão fosfato de sódio

pH – potencial hidrogeniônico

SPSS – Statistical Package for Social Science

TNM – sistema internacional de classificação de tumores malignos

UICC – Union Internationale Contre le Cancer

V – volumes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos.....	13
Tabela 2 - Análise de média, erro padrão da média, intervalo de confiança e desvio padrão da variável Idade.....	51
Tabela 3 - Frequência de micrometástases coradas por Sinaptofisina.....	62
Tabela 4 - Frequência de micrometástases coradas pela Cromogranina A ...	62
Tabela 5 - Comparação das médias de idade entre pacientes sem e com macrometástase pelo teste t de Student.....	69
Tabela 6 - Comparação da frequência de macrometástase por gênero pelo teste exato de Fisher.....	70
Tabela 7 - Comparação da localização central ou periférica dos tumores entre os grupos sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher.....	71
Tabela 8 - Comparação da mediana do maior diâmetro do tumor de pacientes sem e com macrometástase pelo teste de Mann-Whitney.....	72
Tabela 9 - Comparação da frequência de margem cirúrgica acometida pelo tumor em pacientes sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher.....	73
Tabela 10 - Comparação da frequência de micrometástase em pacientes sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher.....	74
Tabela 11 - Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher.....	75
Tabela 12 - Resumo das análises dos grupos sem e com macrometástase..	76
Tabela 13 - Comparação das médias de idade entre pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste t de Student.....	77
Tabela 14 - Comparação da frequência de macrometástase/ grupo de células tumorais por gênero pelo teste exato de Fisher.....	78
Tabela 15 - Comparação da localização central ou periférica do tumor entre os grupos sem e com macrometástases/ grupo de células tumorais pelo teste exato de Fisher.....	79

Tabela 16 - Comparação da mediana do maior diâmetro do tumor de pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste de Mann-Whitney.....	80
Tabela 17 - Comparação da frequência de margem cirúrgica comprometida pelo tumor em pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste t de Student.....	81
Tabela 18 - Comparação da frequência de micrometástase por célula tumoral isolada em pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste exato de Fisher.....	82
Tabela 19 - Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células pelo teste exato de Fisher.....	83
Tabela 20 - Resumo das análises dos grupos sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais.....	84
Tabela 21 - Comparação das médias de idade entre os pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste t de Student.....	85
Tabela 22 - Comparação entre as frequências de pacientes sem e com qualquer tipo de metástase linfática por gênero pelo teste exato de Fisher.....	86
Tabela 23 - Comparação da localização central ou periférica do tumor entre os grupos sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste exato de Fisher.....	87
Tabela 24 - Comparação das medianas do diâmetro do maior eixo do tumor de pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste de Mann-Whitney.....	88
Tabela 25 - Comparação da frequência de margem cirúrgica comprometida pelo tumor em pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste exato de Fisher.....	89
Tabela 26 - Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste exato de Fisher.....	90
Tabela 27 - Resumo das análises dos grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática.....	90
Tabela 28 - Comparação das médias de idade entre os pacientes sem e com micrometástase pelo teste t de Student.....	91

Tabela 29 - Comparação da frequência de pacientes sem e com micrometástase linfática por gênero pelo teste exato de Fisher...	92
Tabela 30 - Comparação entre as frequências de pacientes sem e com micrometástase pela localização central ou periférica do tumor pelo teste exato de Fisher.....	93
Tabela 31 - Comparação das medianas do diâmetro do maior eixo do tumor de pacientes sem e com micrometástase pelo teste de Mann-Whitney.....	94
Tabela 32 - Comparação da frequência de margem cirúrgica comprometida pelo tumor em pacientes sem e com micrometástase pelo teste exato de Fisher.....	95
Tabela 33 - Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com micrometástase pelo teste exato de Fisher.....	96
Tabela 34 - Resumo das análises dos grupos sem e com micrometástase linfática.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para Sinaptofisina em aumento de 200x com visualização de “Tumortet”	10
Figura 2 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para Sinaptofisina em aumento de 50x demonstrando micrometástase do tipo grupo de células neoplásicas (diâmetro 0,2 a 2,0mm).....	20
Figura 3 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para Sinaptofisina em aumento de 200x demonstrando micrometástase do tipo células tumorais isoladas.....	21
Figura 4 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para Cromogranina A em aumento de 50x demonstrando vaso linfático na borda convexa do linfonodo.....	25
Figura 5 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para Cromogranina A em aumento de 200x para controle em ilhotas de Langerhans no pâncreas.....	40
Figura 6 - Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica para Sinaptofisina em aumento de 200x para controle em ilhotas de Langerhans no pâncreas.....	40
Figura 7 - Gráfico de distribuição do Gênero.....	51
Figura 8 - Gráfico da freqüência de casos pela idade (distribuição paramétrica).....	52
Figura 9 - Gráfico da distribuição da localização do tumor no pulmão.....	53
Figura 10 - Gráfico da distribuição central ou periférica dos tumores carcinóides broncogênicos.....	54
Figura 11 - Gráfico da avaliação do maior diâmetro do tumor.....	55
Figura 12 - Gráfico da distribuição do estadiamento T.....	56
Figura 13 - Gráfico das ressecções pulmonares realizadas.....	57
Figura 14 - Gráfico de avaliação da margem cirúrgica comprometida.....	58

Figura 15 - Gráfico de avaliação de linfonodos acometidos por macrometástase.....	59
Figura 16 - Gráfico de ocorrência de metástase hematogênica no pós-operatório.....	65

RESUMO

Moraes-Neto, DM. *Predição do risco individual de micrometástase do tumor carcinóide típico broncopulmonar em função de variáveis clínicas, anatomopatológicas e biomarcadores teciduais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução: Os tumores carcinóides broncopulmonares típicos são proliferações malignas neuroendócrinas. Até bem pouco tempo eram consideradas como adenomas, isto é, tumores benignos. Porém com o avanço dos estudos anatomopatológicos, foi identificada a sua face maligna, pois apresenta as principais características das neoplasias malignas, quais sejam: metástase e invasão tecidual local. Além das metástases, estes tumores são capazes de produzir outra entidade ainda pouco estudada e conhecida que é a micrometástase. Estas correspondem a metástases menores que 2mm de diâmetro, que podem ou não se desenvolver, causando recidiva tumoral. Por sua vez as micrometástases são divididas em grupos de células tumorais, com diâmetro de 0,2 a 2mm e células tumorais isoladas, com diâmetro menor do que 0,2 mm. A literatura nos mostra que a incidência de micrometástase varia entre 10 a 90% dos pacientes em diversos tumores estudados. No caso dos carcinóides típicos temos pouca informação a respeito, sendo que a literatura nos mostra que a micrometástase em tumores carcinóides é considerada com fator de pior prognóstico. Porém não é o que observamos clinicamente, uma vez que temos o seguimento de inúmeros pacientes por mais de 10 anos, sem a recidiva tumoral em linfonodos mediastinais (seguimento clínico-radiológico). **Objetivos:** Verificar a presença de micrometástases em suas diversas formas, em pacientes portadores de carcinóide típico broncopulmonar, e verificar a possibilidade da predição do risco individual destas micrometástases em função de variáveis clínicas, anatomopatológicas e biomarcadores teciduais. **Casuística e Métodos:** Quarenta e nove pacientes portadores de carcinóide típico broncopulmonar com acompanhamento mínimo de 5 anos foram estudados. Todos foram submetidos a ressecção linfonodal por amostragem ou radical. As seguintes variáveis foram coletadas dos prontuários ou por entrevista: gênero, idade, localização do tumor em relação à carina (central ou periférico), diâmetro da lesão, comprometimento da margem cirúrgica, estadiamento TNM, ocorrência de metástases linfonodais, bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia em relação ao total dissecado, metástases à distância e tempo de sobrevivência. Os linfonodos foram analisados por coloração de hematoxilina-eosina e por imuno-histoquímica (Sinaptofisina e Cromogranina A) para pesquisa de micrometástase. **Resultados:** O grupo foi composto por 19 homens (38,8%) e 30 mulheres (61,2%). A idade média dos pacientes foi de 41,3 anos. Houve uma distribuição regular entre todos os lobos pulmonares acometidos. Em relação às vias aéreas, 78% dos tumores eram centrais e

22% eram periféricos. O diâmetro do maior eixo do tumor primário dos 49 pacientes variou de cinco a 80 milímetros, com mediana de 25 e intervalo interquartil 25 a 75% entre 16 e 35 milímetros. Em 54% dos casos foi realizada lobectomia pulmonar, 18% pneumonectomia, 12% bilobectomias e 16% procedimentos poupadores (segmentectomias, broncoplastias e nodulectomias). Em 12% dos casos houve comprometimento da margem cirúrgica. Em 42,8% dos casos houve imunomarcagem por pelo menos um dos biomarcadores Sinaptofisina ou Cromogranina A para micrometástase. Em 18,4% dos casos foi diagnosticada macrometástase linfática, e em 1 caso ocorreu metástase hematogênica. Foram realizadas 4 baterias de testes avaliando os grupos sem e com metástases/micrometástases para se verificar a possibilidade de predição do risco individual de micrometástase. **Conclusão:** Foi possível encontrar micrometástases linfáticas utilizando imuno-histoquímica (Sinaptofisina e Cromogranina A). Não foi possível prever o risco individual de micrometástases nos grupos estudados. Não houve diferença entre os grupos sem e com qualquer tipo de micrometástase. Não foi possível estabelecer correlação entre incidência de metástase e micrometástase nesta amostra populacional.

Descritores: 1.TUMOR CARCINÓIDE/classificação 2.TUMORES NEUROENDÓCRINOS/classificação 3.METÁSTASE/patologia 4.MICROMETÁSTASE/patologia

SUMMARY

Moraes-Neto, DM. *Prediction of the individual risk of micrometastasis of the bronchopulmonary carcinoid tumors in function of clinical and anatomopathological features and biomarkers.* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Introduction: The typical lung carcinoids are neuroendocrine tumors. Until short time ago they were considered adenomas, that is, benign tumors. Although, due to the anatomopathologic advances, it was identified its malignant behavior, once it presents the main characteristics of the malignant tumors: metastasis and local invasion. Beyond the metastasis, this tumor is able to produce another entity not yet well studied, the micrometastasis. This corresponds to metastasis shorter than 2mm in diameter that can or not develop and cause tumoral recurrence. The micrometastasis are divided in two groups: clusters, with diameter between 0,2 and 2mm, and isolated tumor cells, with diameter less than 0,2mm. The medical literature shows that the incidence of micrometastasis of different tumors has a wide variation, between 10 to 90%. In the case of the typical lung carcinoids few information is presented, and the presence of the micrometastasis worsen prognosis. On the other hand this is not what we usually see clinically, once the follow up of numerous patients of our casuistic for more than 10 years did not show the recurrence of the disease in the mediastinal lymphnodes. **Objectives:** Verify the presence of micrometastasis in its various forms in patients comited by lung carcinoid tumors and verify the possibility to predict the individual risk of micrometastasis from clinical and anatomopathological variables and tissue biomarkers. **Casuistic and Methods:** Forty nine patients with lung carcinoid tumors with follow up of at least 5 years were studied. All of them were submitted to mediastinal lymphnode dissection during the surgical procedure. The data collected was: age, gender, tumor location (central or peripheral), diameter, compromised surgical edge, TNM stage, lymphatic metastasis, hematogenic metastasis and survive. The lymphnodes were analised by Hematoxilín-Eosin and immunohistochemistry (Synaptophysin and Chromogranin A) in order to search for micrometastasis. **Results:** There were 19 men (38,8%) and 30 women (61,2%) with a mean age of 41,3 years. There was a regular distribution in all pulmonary lobes. There were 78% of central and 22% periferic tumors. The diameter varied between 0,5 to 80mm, with median in 25. In 54% of the cases was performed pulmonary lobectomy, in 18% pneumonectomy, in 12% bilobectomy and in 16% other procedures (bronchoplasty, wedge resection, nodulectomy). In 42,8% there was immunostaining with Synatophysin or Chromogranin A to micrometastasis. In 18,4% was diagnosed macrometastasis and in 1 case there was haematogenic metastasis. It was done 4 batteries of statistical tests to verify the possibility of prediction of the individual risk of micrometastasis. **Conclusion:** It was possible to find lymphatic micrometastasis using immunostaining with Synaptophysin and Chromogranin A. It was not possible to predict the individual risk of micrometastasis in the studied groups. There was no difference between

the groups with or without micrometastasis. It was not possible to establish a correlation between the incidence of macro and micrometastasis in this population.

Key words: 1. CARCINOID TUMORS/classification 2. NEUROENDOCRINE TUMORS/classification 3. METASTASIS/ pathology
4.MICROMETASTASIS/pathology

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Há centenas de anos a ciência busca incessantemente o entendimento e a cura dos processos mórbidos do corpo humano. Dentre estes processos, as neoplasias podem constar no rol principal, juntamente com as doenças crônico-degenerativas e infecto-parasitárias. As neoplasias malignas, denominadas popularmente como "cânceres", vêm obtendo destaque mundial devido ao aumento gradual de sua incidência, fato este explicado pelos excessos e maus hábitos da população e ainda pela melhoria dos meios diagnósticos.

Dentre as neoplasias, tem-se visto que as originárias do pulmão, principalmente as de origem broncogênica, vêm nos últimos anos causando o sofrimento e a morte de milhares de pacientes. Atualmente as neoplasias de pulmão são as que mais causam óbito no mundo. Por outro lado, um pequeno contingente deste grupo, os tumores carcinóides típicos broncopulmonares, tumores pulmonares de origem neuroendócrina, têm passado despercebido no cenário de dor e sofrimento causados pelos cânceres. São tumores considerados desde a sua identificação até há pouco tempo como benignos (adenomas), e atualmente como tumores de baixo potencial maligno. Porém, vê-se hoje que na prática clínica a situação não é tão simples como se acreditava. Tem-se descoberto pacientes com tumores carcinóides típicos broncopulmonares apresentando metástase durante a dissecação do mediastino ou em algum momento de seu acompanhamento pós-cirúrgico.

Geralmente costuma-se minimizar a real importância clínica da situação. Justifica-se que o risco epidemiológico da ocorrência de metástase ou morte decorrente desses tumores é baixo. Ao se diagnosticar uma metástase

hematogênica em um paciente que já havia recebido alta ambulatorial por estar curado, ou uma metástase linfática durante a análise anatomopatológica, diz-se que este paciente foi vítima do contingente de 10% dos casos de tumor carcinóide típico relatado na literatura médica que apresenta metástase. Porém para este paciente com metástase, a sua evolução é de 100% de sofrimento, uma vez que não terá como opção terapêutica nem a quimioterapia nem a radioterapia convencional ⁴⁶, e que poucos pacientes terão acesso à microrradioterapia-alvo intracelular ou à terapia alvo com nanopartículas, disponível apenas nos sistemas de saúde pública de alguns países europeus ⁴⁸, ⁴⁹. E ainda pior, dado que mesmo estes tratamentos mais avançados podem não ser totalmente efetivos e o paciente pode vir a sucumbir de seu pretensamente dito “tumor de baixa malignidade”, “indolente”.

É imperativo predizer o risco individual da ocorrência de metástases, identificar os pacientes que possuem risco maior para eventos mórbidos e instituir tratamento mais adequado, ao invés de se preconizar o mesmo procedimento indiscriminadamente para todos os pacientes. Ao se instituir a mesma conduta para todos os pacientes, incorre-se no risco de se propor ressecções econômicas e cirurgias poupadoras, como segmentectomias pulmonares ou enucleações, para o tratamento destes tumores em pacientes que eventualmente tenham tumores mais agressivos; assim como o de se proceder a ressecções extensas, como lobectomia ou até mesmo pneumonectomias, dado que muitos desses tumores localizam-se no brônquio principal, com esvaziamento linfático do mediastino e do hilo pulmonar, em pacientes que apresentam tumores realmente indolentes, pouco agressivos, ou eventualmente até mesmo benignos.

Ainda dentro do campo das metástases, tem-se notado o aparecimento destas, com tamanho inferior a 2 milímetros, denominadas micrometástases. Não sabemos ao certo o papel deste fenômeno. São mais precoces do que as metástases, e possivelmente precursor das mesmas. Relatos da literatura têm mostrado que esta situação, isto é, a presença de micrometástases, piora o prognóstico dos pacientes acometidos ⁵².

É neste cenário que o grupo de estudo de Neoplasias Neuroendócrinas do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pautado pela assistência e pesquisa, vem desenvolvendo o seu trabalho de identificação destes casos, na tentativa de estabelecer parâmetros através de critérios clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos para a identificação de possíveis pacientes cuja evolução será desfavorável. Através de estudos realizados pelo grupo nestes pacientes, verificou-se que alguns marcadores imuno-histoquímicos como o p53, Ki-67, Bcl-2, Bax, caspase 3 ativada, LYVE 1, receptor 2 de somatostatina, densidade de micro-vasos e densidade de fibras estromais estão relacionados com metástases ¹⁶. Além disso, o gênero masculino e a posição periférica do tumor também estão relacionados à maior incidência de metástase, assim como a faixa etária elevada possui uma tendência ao mesmo fenômeno.

Poucos trabalhos têm sido publicados em relação à presença de micrometástases nos tumores carcinóides típicos broncopulmonares. Não se tem idéia da real incidência deste fenômeno, nem de que forma isto influencia no processo de morbidade. Entende-se atualmente que as micrometástases são o passo inicial para o desenvolvimento de macrometástases. Portanto este trabalho foi idealizado para se verificar se há presença de micrometástase em

tumores carcinóides típicos broncopulmonares e verificar se há relação entre variáveis clínicas, anatomopatológicas e biomarcadores com o aparecimento e desenvolvimento das mesmas. Além disso, pretende-se construir um modelo de predição de risco individual de micrometástase em pacientes com carcinóide típico broncopulmonar através da análise dessas variáveis candidatas a predizerem o fenômeno.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os tumores carcinóides foram inicialmente descritos por Lubarsch em 1888, quando este encontrou múltiplos tumores no íleo distal em dois pacientes submetidos à autópsia ¹. Porém o termo *karzinoide* foi cunhado por Oberndorfer em 1907 para descrever tumores histologicamente similares aos carcinomas, porém com comportamento mais indolente, isto é, menos agressivo, que poderiam ocorrer tanto no trato respiratório quanto no trato digestório ². Atualmente sabe-se que estes tumores podem se desenvolver em vários tecidos do corpo, nos quais existam células do sistema neuroendócrino difuso. Em todas as classificações iniciais predominava o conceito de que os tumores carcinóides eram benignos e apesar dos relatos de casos com metástases no decorrer do século XX ³, tal concepção errônea perdurou até a década de 1990.

Os tumores carcinóides se originam de células neuroendócrinas denominadas células de Kulchitsky, localizadas na mucosa brônquica ^{4, 5}. Estas células estão presentes em todo o epitélio broncopulmonar, isoladas ou em grupos, porém são mais frequentes nas regiões centrais, isto é, nos brônquios principais e lobares, e mais raras nas regiões periféricas do pulmão ^{5, 6}. As células de Kulchitsky possuem a função de quimiorreceptores e são sensíveis às alterações das pressões de gases alveolares ou sanguíneos ⁷.

As células de Kulchitsky, assim como os tumores carcinóides, são caracterizadas histologicamente por reações positivas às colorações de prata (argentafins) ⁸, porém atualmente utilizam-se técnicas de imuno-histoquímica para o diagnóstico histológico e caracterização neuroendócrina. Os marcadores

utilizados são: Cromogranina A, Sinaptofisina e Enolase Neurônio-específica ⁴,
⁹. Estes marcadores estão associados à proteínas citosólicas, vesículas e aos grânulos secretórios destas células e são específicos para se marcar tecido neuroendócrino.

2.1 ESPECTRO DAS LESÕES NEUROENDÓCRINAS

Considera-se que as lesões neuroendócrinas possuam um espectro crescente de malignidade.

2.1.1 HIPERPLASIA DE CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS

No pólo mais benigno do espectro das lesões neuroendócrinas, encontra-se as diversas formas de proliferação por mera hiperplasia celular, com células neuroendócrinas diferenciadas, que por sua natureza supostamente não neoplásica, obviamente devem sempre respeitar os limites da membrana basal. A Organização Mundial de Saúde define hiperplasia idiopática difusa de células neuroendócrinas pulmonares como: “proliferações generalizadas de células isoladas esparsas, ou em pequenas formações nodulares (corpos neuroendócrinos), ou proliferações lineares das células neuroendócrinas que devem obrigatoriamente estar confinadas ao epitélio brônquico ou bronquiolar,

na ausência de outras causas que possam induzir à proliferação de células neuroendócrinas pulmonares”¹⁰.

2.1.2 “TUMORLETS”

Outra forma de proliferação neuroendócrina são os chamados “Tumorlets”, que são agrupamentos de células neuroendócrinas de até 5 milímetros que podem ocorrer ao redor de processos patológicos nas situações mais diversas tais como neoplasias, infecções e qualquer processo que desencadeie resposta inflamatória. Não é conhecida a causa de tal fenômeno. Para ser considerada “Tumorlet,” a hiperplasia obrigatoriamente deve possuir até 5 milímetros, sendo que a partir deste diâmetro é classificada arbitrariamente como tumor carcinóide típico. Não existem evidências convincentes de que as hiperplasias ou “tumorlets” evoluam para lesões malignas, apesar de opiniões isoladas em contrário¹¹. Algumas evidências epidemiológicas demonstram que cada grupo de proliferações, seja hiperplasia, “tumorlets” ou carcinóides, parece ser independente⁴. (Figura 1)

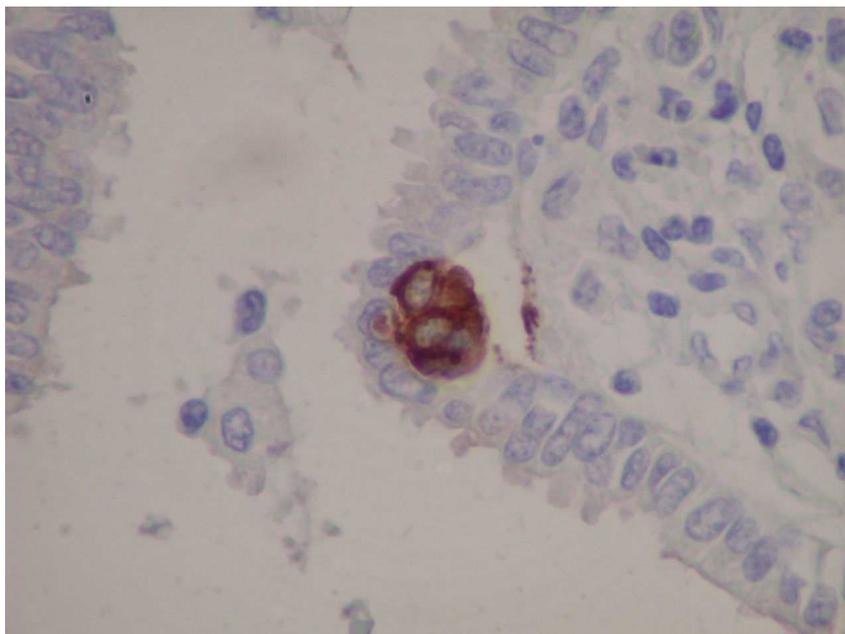


Figura 1 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Sinaptofisina em aumento de 200x com visualização de “Tumortet”.

2.1.3 CARCINÓIDES

Até meados da década de 1980 os tumores carcinóides eram classificados como adenomas por possuírem uma baixa taxa de crescimento. Acreditava-se que sempre teriam uma evolução favorável, com malignidade intermediária entre o hamartoma e os carcinomas broncogênicos primários do pulmão. Esta classificação se baseia na verificação de que estes pacientes possuem altas taxas de sobrevivência ^{12, 13, 14}. Porém, devido ao fato de que pacientes apresentavam metástases hematogênicas e linfáticas, com evolução claramente maligna, demonstrou-se que alguns destes tumores deveriam ser considerados como possíveis carcinomas bem diferenciados ou moderadamente diferenciados, e que exigiam novas classificações e a descoberta de novos

critérios prognósticos ^{5, 8, 15}, para que se pudesse calcular o risco individual da ocorrência de metástases ¹⁶.

2.2. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES NEUROENDÓCRINOS BRONCOPULMONARES

2.2.1. HISTÓRICO DA CLASSIFICAÇÃO

Apesar da distinção entre os tumores carcinóides típico e atípico broncopulmonares ter sido primeiramente descrita por Engelbreth-Holm em 1944 ¹⁷, foi somente em 1972 que critérios foram criados por Arrigone *et al* para separar estes dois tipos pelo grau histológico de malignidade ³. O primeiro foi considerado como neoplasia de baixo grau de agressividade, sem potencial metastático.

A partir desta classificação inicial, tem-se confirmado a existência de um espectro de malignidade dos tumores neuroendócrinos, que se inicia nas hiperplasias neuroendócrinas, passando pelos tumores carcinóides típicos (de baixo grau) e atípicos (de grau intermediário), até neoplasias de alto grau de malignidade como o carcinoma neuroendócrino de grandes células e o carcinoma de pequenas células ^{18, 19, 20}. Entretanto, a distinção entre tumores carcinóides típicos broncopulmonares e outros tumores neuroendócrinos broncopulmonares mais agressivos neste período inicial foi problemático,

apesar da existência de vários esquemas de classificação propostos. Nenhuma destas classificações foi amplamente aceita e aplicada, pois critérios específicos de diagnóstico foram descritos superficialmente ^{8, 21}. A classificação de tumores neuroendócrinos da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1981 define somente que carcinóides atípicos possuem atividade mitótica aumentada, sem, porém, quantificar o número de mitoses por campo, celularidade aumentada e possível presença de necrose ²². Surgiram ainda outras classificações como a de carcinomas de células de Kulchitsky, na qual apenas modificou-se a nomenclatura. O tumor carcinóide típico broncopulmonar foi chamado de carcinoma de célula de Kulchitsky I, o tumor carcinóide atípico broncopulmonar, de carcinoma de célula de Kulchitsky II e o carcinoma de pequenas células, de carcinoma de Kulchitsky III ⁵. As discussões permanecem, pois o curso clínico diverso alerta para a possibilidade de existirem várias entidades nosológicas classificadas como tumor carcinóide típico broncopulmonar.

2.2.2. CLASSIFICAÇÃO ATUAL

Desde a classificação da OMS, de 1999, confirmada pela de 2004, propõe-se um critério mais rigoroso para a classificação dos dois grupos de tumores carcinóides, típico e atípico, tendo sido baseada nos trabalhos de Travis *et al* ^{10, 23}. Esta também traz critérios para a classificação dos demais tumores pertencentes ao espectro de proliferações neuroendócrinas, os carcinomas neuroendócrinos indiferenciados de grandes células e de pequenas células (Tabela 1) ²⁴.

Tabela 1 – Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos

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

Fonte : Travis WD et al, 1999.

CGA – campo de grande aumento

+ - uma cruz / ++ - duas cruces / +++ - três cruces (medida empírica de intensidade).

Os tumores carcinóides típicos possuem os seguintes critérios: morfologia neuroendócrina, menos de duas (2) mitoses/2mm² (10 campos microscópicos de grande aumento – CGA), ausência de necrose e diâmetro acima de cinco milímetros. Os tumores carcinóides atípicos por sua vez possuem os seguintes critérios: morfologia neuroendócrina com duas (2) a dez (10) mitoses/2mm² (10 campos de grande aumento – CGA), ou presença de necrose. Os carcinomas neuroendócrinos de grandes células, assim como os de pequenas células também pertencem a este espectro, possuindo altas taxas mitóticas e presença de necrose, geralmente em grandes áreas^{18, 10, 25}.

Segundo a maioria das séries descritas na literatura, clinicamente os pacientes com tumores carcinóides broncopulmonares típicos tendem a apresentar bom prognóstico, com baixo grau de malignidade evoluindo com baixa incidência de metástases linfáticas e hematogênicas, com taxas de cinco

anos de sobrevivência entre 87% a 100%^{18, 26, 27}. Porém, um estudo franco-brasileiro, que acompanhou por mais de dez anos duas coortes de 330 pacientes operados por tumor carcinóide típico, apresentou uma incidência de metástases linfáticas por volta de 20% e de hematogênicas por volta de 10%¹⁶. Já os tumores carcinóides atípicos apresentam um grau de malignidade maior, exigindo uma intervenção mais agressiva para tratamento adequado, isto é, lobectomia pulmonar. Eles apresentam metástases para linfonodos mediastinais em 30% a 50% dos casos^{28, 29}.

2.3. APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Os tumores carcinóides broncopulmonares representam cerca de 25% de todos os tumores carcinóides do organismo, tendo maior freqüência no trato gastrointestinal^{26, 31}. Também correspondem a 0,5% a 5% dos tumores primários de pulmão^{26, 32, 33}. Os tumores carcinóides típicos perfazem 60% a 70% dos tumores carcinóides broncopulmonares, e os atípicos de 30% a 40%^{25, 27, 28}.

Vários estudos epidemiológicos acerca dos tumores carcinóides broncopulmonares têm sido realizados, baseados em séries clínicas e patológicas e registros populacionais, mostrando um aumento da incidência dos mesmos nas últimas décadas^{10, 34-37}. Alguns autores atribuem este fato à melhor utilização e maior capacidade de diagnóstico das formas de exames complementares^{25, 36}. Apesar da taxa exata de incidência dos tumores neuroendócrinos ser

desconhecida, devido à sua variação em diferentes populações e diferentes tipos de estudos, a incidência estimada é de 1 a 2/ 100000 habitantes^{26, 30, 34}.

Os pacientes com carcinóide típico broncopulmonar geralmente se encontram entre a quarta e a sexta décadas de vida^{14, 33}, sendo que a maioria apresenta tumores centrais em sua localização. Cerca de 60% a 90% destes pacientes são sintomáticos, sendo que os principais sintomas são decorrentes da obstrução parcial ou total da luz da via aérea, e são os seguintes: tosse, hemoptise e dor torácica. Podem também desenvolver pneumonias de repetição^{25, 38}. Entretanto, os tumores periféricos são assintomáticos na sua grande maioria, e em muitos casos podem ser diagnosticados apenas em exames de rotina, como descrito em uma série francesa, onde os pacientes tinham diagnóstico de tumor carcinóide típico broncopulmonar em exames realizados pelo sistema público de medicina do trabalho¹⁶.

A maioria dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares apresenta habitualmente um comportamento indolente, de crescimento lento e sem sinais de invasão ou metástase. Porém 10% a 15% destes pacientes desenvolvem metástase linfática e/ou hematogênica, mostrando uma evolução diferente da esperada para esta classe de tumores, com sobrevivência reduzida^{26, 39, 19}. Fica então o questionamento se somente os critérios histopatológicos clássicos são realmente suficientes para se realizar uma classificação prognóstica dos tumores carcinóides, ou se existe a necessidade da análise de novos critérios, dentre eles, por exemplo, os biomoleculares, para uma melhor estratificação desta neoplasia³⁰.

2.4. TRATAMENTO

2.4.1. CIRURGIA

O atual tratamento de escolha, com intuito curativo, para os tumores carcinóides típicos broncopulmonares, é a ressecção cirúrgica. É o único procedimento que se pode dizer que possibilita a cura^{18, 31, 39, 40}. Devido à baixa incidência de metástases linfática e hematogênica relatadas na literatura, existe uma tendência a se utilizar procedimentos poupadores do parênquima pulmonar (enucleações, broncoplastias, segmentectomias e ressecções em cunha)^{18, 28, 31, 41}, em detrimento ao tratamento clássico que é utilizado nos casos de carcinomas não-pequenas células do pulmão, que é a lobectomia pulmonar ou pneumonectomia com dissecação linfática hilar e mediastinal ipsilaterais⁴².

2.4.2. QUIMIOTERAPIA

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

Existem apenas trabalhos mais antigos que descrevem tratamento quimioterápico tradicional para estes tumores^{43, 44, 45}. Estes regimes eram

baseados nos derivados de platina (cisplatina e etoposide) ou incluíam ciclofosfamida, doxorrubicina e vincristina ²⁵. Os resultados devem ser avaliados com critério, devido ao pequeno número de pacientes em cada um destes estudos, sendo que não existem ainda evidências satisfatórias de real benefício com a utilização destes regimes ⁴⁰.

2.4.3. RADIOTERAPIA

A radioterapia após ressecção tumoral em carcinóides broncopulmonares típicos parece ser controversa. A utilização de radioterapia pós-operatória para controle local não difere da evolução natural da doença quando se realiza apenas cirurgia ⁴⁶. A utilização de radioterapia em doença avançada e para controle paliativo de lesões sintomáticas têm demonstrado eficácia ⁴⁷. Dentre estas lesões sintomáticas, as lesões ósseas metastáticas são as mais tratadas com radioterapia. A utilização de radioterapia pós-operatória em pacientes com tumor carcinóide atípico com linfonodos positivos, os quais têm uma taxa local de recorrência maior, pode ser benéfica ⁴⁶.

Atualmente, em uso na prática clínica há décadas em serviços europeus, pode-se lançar mão da microrradioterapia intracelular sob os preceitos da terapia alvo. Nesta modalidade terapêutica isótopos citotóxicos são transportados às células malignas com o auxílio de análogos de somatostatina administrados de forma intravenosa ^{48, 49, 50}.

2.5. METÁSTASES

2.5.1. MACROMETÁSTASES

Metástases são implantes tumorais sem continuidade com o tumor primário. Esta é a característica principal de um tumor maligno, pois o benigno não possui esta capacidade. A invasividade do tumor lhe permite penetrar em vasos linfáticos e sanguíneos, além de cavidades, permitindo oportunidades de disseminação ⁵¹.

Os tumores carcinóides broncopulmonares típicos também possuem esta capacidade, sendo este o principal motivo de serem classificados como neoplasia maligna ¹⁶. Cerca de 10 a 15% dos pacientes desenvolvem metástase linfática e/ou hematogênica, evoluindo com sobrevivência reduzida ^{19, 26, 39}.

2.5.2. MICROMETÁSTASES E CÉLULAS TUMORAIS ISOLADAS

Sabe-se ainda que os carcinóides típicos broncopulmonares podem produzir micrometástases, isto é, metástases menores do que 2 milímetros, em linfonodos mediastinais ⁵². Este fenômeno pode representar, segundo alguns autores, um sinal de agressividade. No momento ainda não se sabe exatamente a real incidência deste fenômeno e se esta situação influi realmente de forma

negativa no prognóstico do paciente. Teoricamente, se fosse feita uma análise simplificadora da questão, poder-se-ia dizer que a incidência seria a mesma do que a de macrometástase, e que todas as micrometástases tardiamente evoluiriam para macrometástases devido ao crescimento tumoral. Entretanto, ainda não há evidência que suporte tal hipótese, mas a literatura e a experiência no ambulatório de tumores neuroendócrinos de pulmão no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo mostram a existência de pacientes que apresentam recidiva tardia dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares nos linfonodos mediastinais, fato que corrobora a informação acima para alguns pacientes, isto é, que algumas micrometástases poderiam aumentar em tamanho e evoluir para macrometástase ^{18, 25}. Este fato é relevante, no sentido de se sugerir que o prognóstico desta doença depende da presença de linfonodos comprometidos pelo tumor, seja por macrometástase ou micrometástase, possuindo impacto negativo na qualidade de vida, e talvez na sobrevivência dos pacientes ^{26, 41, 52}.

Além das micrometástases, ainda podemos encontrar as células ou grupos de células menores do que 0,2 milímetros, que são determinadas como células tumorais isoladas ou células dormentes ⁵³. Este fenômeno foi identificado pela utilização de imuno-histoquímica a partir da década de 80 para avaliação de linfonodos e outros tecidos de pacientes portadores de neoplasias malignas. As células tumorais isoladas são encontradas em 15 a 90% de pacientes, considerando-se todos os tipos tumorais. Estes achados têm sido considerados indicadores relevantes de prognóstico e podem ser utilizados como critério de escolha para tratamentos mais agressivos ou para terapia adjuvante. Desta forma tem existido a necessidade da inclusão das células tumorais isoladas no

estadiamento TNM. Porém a real importância das células tumorais isoladas avaliadas como um fator independente de prognóstico ainda está por ser provada ⁵⁴. (Figuras 2 e 3)

A classificação TNM adota o seguinte critério em relação às micrometástases e células tumorais isoladas: em caso de metástases menores do que 2 milímetros (micrometástases) a nomenclatura se torna pN1(mi) ou pN2(mi). Em caso de células tumorais isoladas, como não existe evidência de atividade tumoral destes grupamentos, elas são classificadas como N0 ou M0 (em caso de células em outros órgãos ou tecidos que não o linfático) ⁵³.

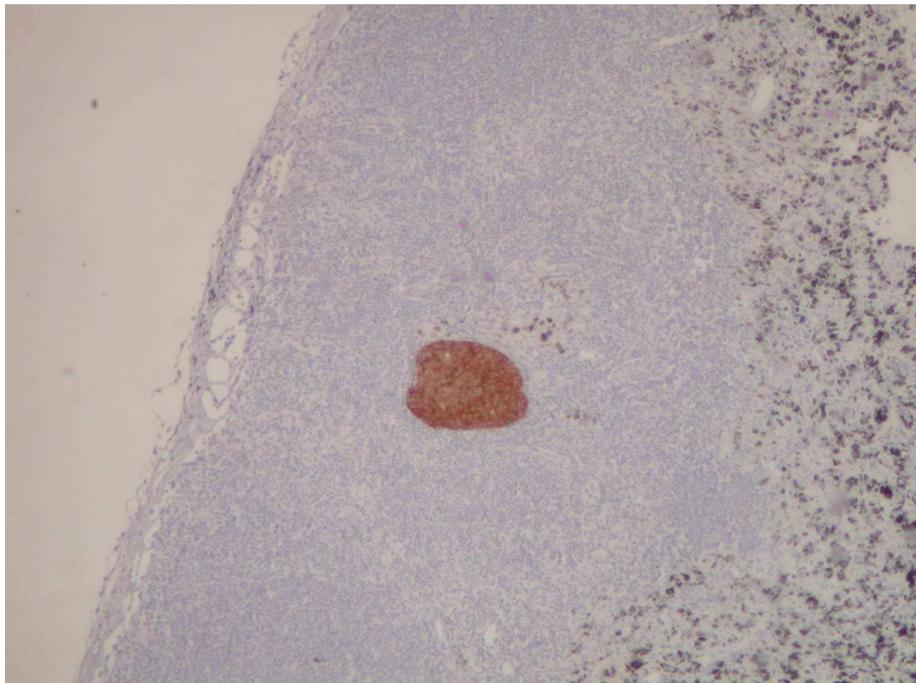


Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Sinaptofisina em aumento de 50x demonstrando micrometástase do tipo grupo de células neoplásicas (diâmetro 0,2 a 2,0mm).

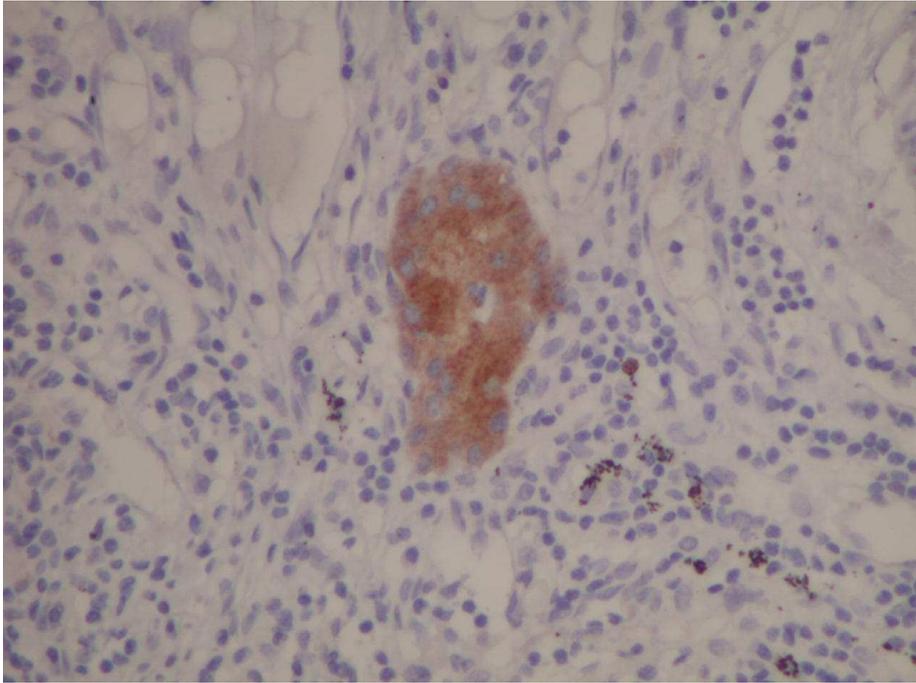


Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Sinaptofisina em aumento de 200x demonstrando micrometástase do tipo células tumorais isoladas.

2.6. EMBRIOLOGIA

Para melhor compreensão das metástases e micrometástases faremos uma abordagem da embriologia, anatomia e fisiologia 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, independente do sistema venoso; e a teoria centrípeta ou origem conjunta com o sistema venoso.

2.6.1. A TEORIA CENTRÍFUGA OU INDEPENDENTE

A teoria centrífuga (ou *de novo*) suporta que nos estágios iniciais do desenvolvimento dos linfáticos, os sacos linfáticos se desenvolvem independentemente do endotélio venoso, e através das células endoteliais espalhadas nos tecidos e órgãos adjacentes formam a rede linfática⁵⁵.

2.6.2. 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 centro⁵⁵.

Existem evidências científicas que suportam as 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 mesenquimais.

2.7 ANATOMIA

Os linfonodos, assim como o timo, baço e a medula óssea, pertencem ao grupo de órgãos denominados órgãos linfáticos, parte integral do sistema imune^{56, 57}. Os linfonodos apresentam ampla distribuição no corpo, local de presença

de células imunitárias, proporcionando ao organismo um sistema eficiente de defesa. São mais freqüentes em órgãos que têm contato maior com o meio externo, como a pele ou a cavidade oral⁵⁷.

Os linfonodos são órgãos encapsulados que aparecem sempre no trajeto de vasos linfáticos. Pouco se sabe a respeito de sua origem embriológica⁵⁷. A região mediastinal do tórax é rica nestas estruturas. Em sua maioria aparentam forma ovalada ou riniforme e têm um lado convexo e outro côncavo, o hilo, por onde penetram as artérias nutridoras e saem as veias⁵⁸. Têm tamanho variado, sendo os menores com 1 milímetro de diâmetro, podendo chegar até 1 a 2 centímetros. Em processos patológicos, podem aumentar ainda mais, ou eventualmente se fundirem formando conglomerados. Em situações onde se encontram linfonodos maiores do que 3 centímetros deve-se suspeitar de processos malignos. Funcionam como barreiras através dos quais a linfa é filtrada durante seu trajeto em direção ao sangue⁵⁹.

Em nosso meio, um trabalho conduzido pelo Dr Aurelino Schmidt, conclui que em cadáveres do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo, linfonodos de até dois e eventualmente três centímetros no maior diâmetro devem ser considerados normais em algumas cadeias⁶⁰.

Entretanto, não há trabalhos em nosso meio que descreva as dimensões que devam ser consideradas normais para linfonodos do mediastino de pacientes brasileiros vivos, hígidos e doentes. Norte-americanos, europeus e japoneses consideram o limite de um centímetro de maior diâmetro como sendo normal do ponto de vista epidemiológico.

2.8 HISTOLOGIA

A sustentação do linfonodo é dada pela cápsula, estrutura constituída por tecido conjuntivo denso ^{58, 59}. As trabéculas, que são projeções da cápsula, também ajudam na sustentação. O parênquima do linfonodo apresenta uma região denominada cortical, localizada logo abaixo da cápsula, mais externa, e a região medular, que ocupa o centro do órgão e seu hilo. Entre essas duas regiões encontra-se a cortical profunda. A região cortical superficial é constituída por tecido linfóide frouxo, que forma os seios subcapsulares e peritrabeculares e por folículos linfáticos (condensações esféricas de linfócitos). Ocasionalmente estes folículos são encontrados em regiões mais internas.

2.9 FISILOGIA

A circulação da linfa nos linfonodos é unidirecional ⁵⁸. Ela penetra o parênquima do linfonodo por vasos linfáticos denominados aferentes que desembocam na borda convexa da cápsula, no seio subcapsular, sendo transportada até os linfáticos do hilo denominados eferentes ⁶¹. Este também é o fluxo das células metastáticas tumorais quando transitam neste local. (Figura 4)

A passagem da linfa pelo linfonodo remove, por fagocitose pelos macrófagos cerca de 99% das moléculas, microorganismos e células estranhas

⁵⁶. Esta função se dá principalmente nos seios subcapsulares, região rica em macrófagos ⁵⁷.

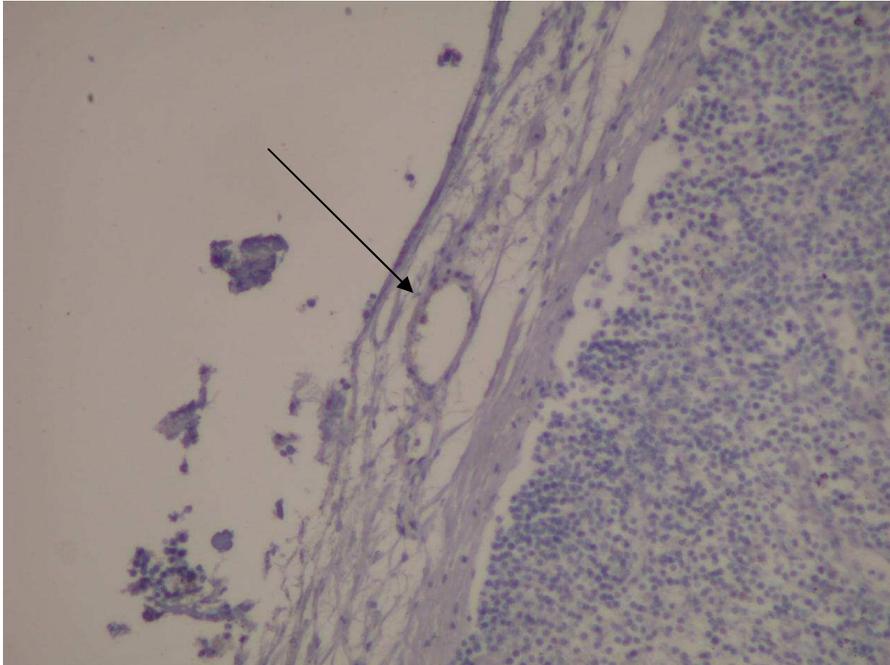


Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Cromogranina em aumento de 50x demonstrando vaso linfático na borda convexa do linfonodo (seta).

2.10 MICROMETÁSTASE EM TUMORES CARCINÓIDES

Existe apenas uma publicação na literatura médica indexada a respeito de micrometástases em tumores carcinóides broncopulmonares. Este trabalho datado de 2005 realiza estudo em 55 pacientes com tumores carcinóides broncopulmonares típicos e atípicos. Neste, demonstra-se um aumento estatisticamente significativo de comprometimento linfonodal quando se faz

estudo de imuno-histoquímica para avaliação de micrometástases. O estudo tem como conclusão que a linfadenectomia sistemática de rotina para tratamento de tumores carcinóides e o estudo dos linfonodos com método de imuno-histoquímica para detecção de micrometástase contribui para a identificação de uma maior população sob risco de recorrência tumoral, permitindo uma melhor avaliação do estadiamento para os tumores carcinóides. O estudo também conclui que dentre os fatores prognósticos estudados pelo trabalho, apenas o tipo histológico (carcinóide típico ou atípico) e o comprometimento linfonodal (presença de micrometástases) influenciam no tempo de sobrevida⁵².

Todos os demais estudos são referentes a carcinomas broncogênicos não-pequenas células de pulmão, carcinomas de esôfago, de região cervical, cólon e outros^{62, 63, 64}.

Esta avaliação de micrometástases em linfonodos locorregionais em carcinomas pulmonares não-pequenas células tem sido realizada por vários métodos. Em todos os trabalhos existe a detecção de micrometástases em linfonodos considerados livres de células malignas apenas pela coloração tradicional por hematoxilina-eosina (em até 28% dos linfonodos avaliados), com alteração do estadiamento e conseqüentemente da sobrevivência livre de doença^{62, 63, 64, 65}.

A partir do fato observado no ambulatório de tumores neuroendócrinos do pulmão do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, de que existem pacientes com tumores carcinóides típicos broncopulmonares que apresentam recidiva em linfonodos mediastinais, e que possivelmente algumas destas

recidivas estão relacionadas às micrometástases, propõe-se um estudo para se avaliar a predição do risco individual de micrometástase deste tumor em função de variáveis clínicas, anatomopatológicas e biomoleculares, incluindo como variável candidata a ser preditiva também a presença de macrometástase.

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

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é verificar as seguintes hipóteses:

Hipótese 1 : Existem micrometástases linfáticas oriundas de tumores carcinóides típicos broncopulmonares que podem ser diagnosticadas através de coloração imuno-histoquímica pelos biomarcadores Sinaptofisina e Cromogranina A.

Hipótese 2 : as seguintes variáveis independentes são preditivas do evento micrometastático:

- Idade
- Gênero
- Localização central ou periférica do tumor
- Diâmetro do maior eixo do tumor
- Margem cirúrgica acometida por tumor
- Presença de micrometástases
- Metástase hematogênica

Hipótese 3 : é possível estabelecimento de um índice numérico que represente o risco individual de acometimento por micrometástase em pacientes com tumor carcinóide típico broncopulmonar em função de variáveis demográficas, clínicas, anatomopatológicas e biomoleculares, produzido através de análise multivariada por regressão logística.

Hipótese 4 : existe correlação entre incidência de metástase e micrometástase.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O projeto de pesquisa (Protocolo de Pesquisa nº 0073/07) foi analisado e teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14 de março de 2007 (Anexo C).

Desenho de Estudo

Um estudo retrospectivo de uma amostra provinda de duas coortes de pacientes operados por tumor carcinóide típico broncopulmonar.

Instituições envolvidas no estudo

Os Serviços de cirurgia torácica do HCFMUSP e do Hôpital Européen Georges Pompidou da Universidade Paris VI, em Paris, França.

4.1 CASUÍSTICA

A presente casuística constitui-se de material obtido a partir de 51 pacientes operados para tratamento de tumores carcinóides típicos broncopulmonares que também foram submetidos à ressecção linfática mediastinal. Os dados dos indivíduos foram obtidos de forma retrospectiva por análise de prontuário, tendo estes sido operados e acompanhados no Serviço de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardiopneumologia do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (37 casos) e no Hospital George Pompidou da Universidade de Paris VI (14 casos) no período de 1981 a 2003.

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

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

Os dados correspondentes ao seguimento do paciente que não constavam nos prontuários disponíveis foram completados por meio de entrevista após convocação para o ambulatório de tumores neuroendócrinos do Serviço de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardiopneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, comunicação pessoal, visitas domiciliares ou questionários enviados aos familiares. Os dados dos pacientes do Hospital George Pompidou da Universidade de Paris VI foram todos coletados pelos respectivos prontuários.

Como critérios de inclusão utilizou-se a confirmação do diagnóstico histológico do tumor primário como carcinóide típico broncopulmonar, disponibilidade de dados referentes ao estadiamento TNM, seguimento de 5 anos completos, exame de tomografia computadorizada de tórax ao final desse período e presença de dissecação linfonodal durante ato operatório para ressecção do tumor primário, obtendo-se pelo menos 2 linfonodos. A verificação do estadiamento linfonodal foi obtida pela revisão histológica dos linfonodos ressecados e ausência radiológica ou intra-operatória do aumento do volume dos mesmos. Considerou-se como positiva a presença de metástase à distância, a confirmação histológica do diagnóstico de carcinóide típico broncopulmonar na lesão metastática; e ausência, a descrição em prontuário da ausência de sinais, sintomas ou evidência do fenômeno em método diagnóstico por imagem no acompanhamento.

Foram excluídos os portadores das Síndromes de Neoplasias Endócrinas Múltiplas, pois a ocorrência das lesões em múltiplos órgãos poderia representar metástase ou segundo foco primário, e também os indivíduos cujo diagnóstico foi de tumor carcinóide atípico ou carcinoma neuroendócrino de grandes células segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde de 1999 ⁵⁹, além dos pacientes que não foram submetidos à linfadenectomia durante o procedimento de ressecção tumoral.

Dos 37 casos provenientes do Serviço de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardiopneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, dois (2) foram excluídos por reclassificação histológica. Inicialmente foram diagnosticados como tumores carcinóides típicos broncopulmonares, porém após análise histológica

mostraram-se como tumores carcinóides atípicos. Todos os casos provenientes do Hospital George Pompidou da Universidade de Paris VI foram confirmados como carcinóides típicos broncopulmonares.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

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

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

Foram montados cortes histológicos de 3 μm de cada bloco do tumor primário e linfonodos sobre lâminas e corados por hematoxilina-eosina. Estas foram revistas separadamente e de forma aleatória por dois patologistas com experiência na análise de carcinóides broncopulmonares. Os casos nos quais o diagnóstico foi de proliferação neuroendócrina bem diferenciada com diâmetro inferior a 5mm (*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. Os patologistas não tinham conhecimento prévio do diagnóstico das lâminas. Foram incluídos no estudo somente os casos nos quais houve concordância no diagnóstico de tumor carcinóide típico broncopulmonar 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 200x. Já a classificação histológica obedeceu aos critérios da Organização Mundial de Saúde²⁴ (Tabela 1).

Os linfonodos extraídos também foram analisados pelos dois patologistas para verificação do estadiamento. Da mesma forma, foram incluídos somente os casos nos quais houve concordância.

4.2.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

Os prontuários de todos os pacientes foram analisados e foram recuperados os seguintes dados:

- Idade
- Gênero
- Localização central ou periférica do tumor
- Diâmetro do maior eixo do tumor
- Margem cirúrgica acometida por tumor
- Presença de micrometástases
- Metástase hematogênica
- Óbito

4.2.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a seleção das lâminas que seriam analisadas por imuno-histoquímica, pela análise inicial através da coloração de hematoxilina-eosina, as lâminas obtidas a partir dos blocos dos 49 pacientes escolhidos foram preparadas para a marcação imuno-histoquímica para Sinaptofisina e Cromogranina A para diagnóstico de possíveis micrometástases.

4.2.3.1 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

4.2.3.1.1 TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA EMPREGADA NA DETECÇÃO DOS ANTÍGENOS SINAPTOFISINA E CROMOGRANINA A

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

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

A técnica de imuno-histoquímica aplicada seguiu o seguinte protocolo⁵⁶ : primeiramente as lâminas foram desparafinizadas (permaneceram 20 minutos

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

Diluíram-se então os seguintes anticorpos primários (cada um em um recipiente distinto) em Soro de Albumina Bovina (BSA), Sigma: sinaptofisina diluição 1:1200 (Novocastra Laboratory, Newcastle, United Kingdom) e cromogranina A diluição 1:1200 (Novocastra Laboratory, Newcastle, United Kingdom) . Todas as lâminas foram cobertas com 100 µL dessas soluções e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas.

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

secundário por 1 hora a 37°C, e lavou-se as lâminas em tampão PBS que a seguir foram incubadas pela Estreptoavidina-Biotinilada Peroxidase por 45 minutos a 37°C.

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

Para controle positivo, corado simultaneamente às reações descritas, utilizou-se fragmento de pâncreas, sabidamente positivo para Sinaptofisina e Cromogranina A (Figuras 5 e 6). Para controle negativo, os mesmos cortes foram incubados com BSA, sem adição de anticorpo.

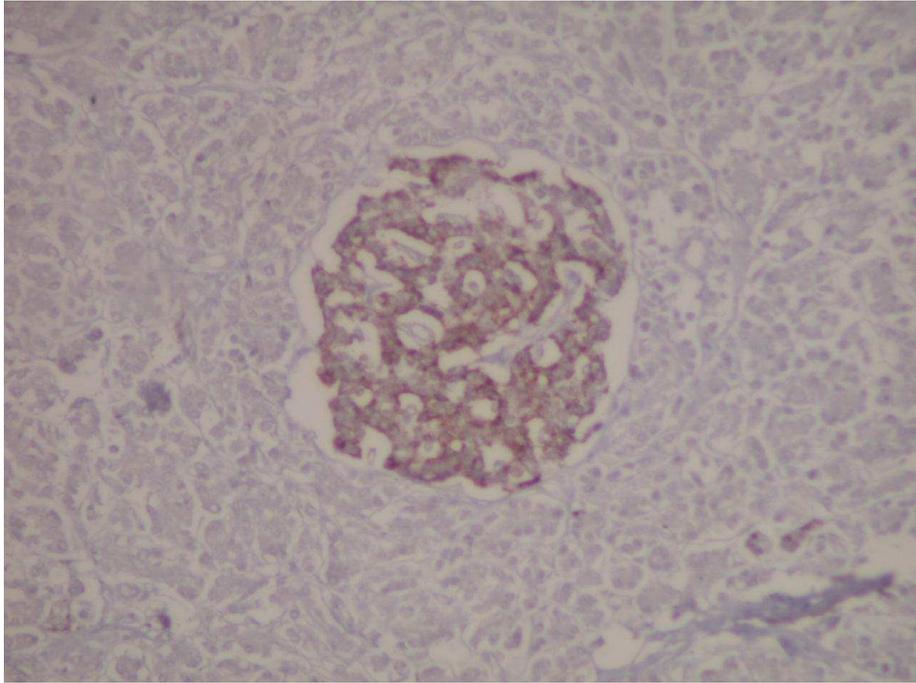


Figura 5 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Cromogranina A em aumento de 200x para controle em ilhotas de Langerhans no pâncreas.

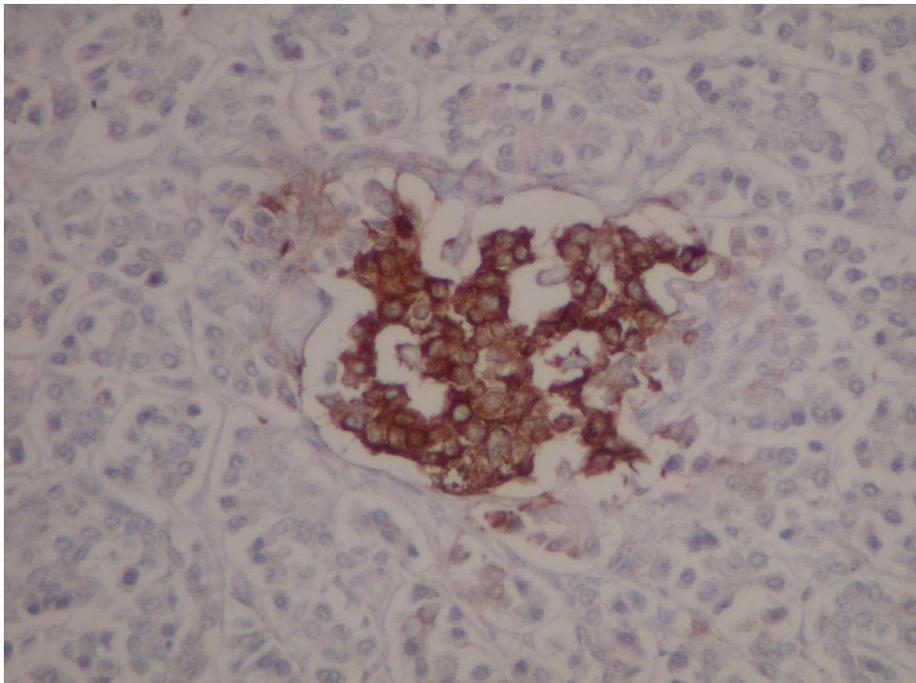


Figura 6 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para Sinaptofisina em aumento de 200x para controle em ilhotas de Langerhans no pâncreas.

4.2.3.2 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE MICROMETÁSTASES LINFÁTICAS

As lâminas coradas pelos anticorpos Sinaptofisina e Cromogranina A foram analisadas por microscopia óptica por patologistas experientes em tumores neuroendócrinos de pulmão. Não houve necessidade de captura de imagens para medições, pois o diagnóstico tinha apenas como objetivo a classificação binária nas duas seguintes categorias: positivo ou negativo.

Foram consideradas como formas de micrometástase as células tumorais isoladas (células ou grupos celulares menores que 0,2mm) e o grupo de células tumorais (“cluster”), grupos celulares com diâmetro de 0,2 a 2mm, todos com características morfofuncionais semelhantes às células dos tumores neuroendócrinos²⁴.

Não existe controle interno positivo em linfonodos para nenhum dos marcadores.

Como controle externo positivo foram utilizadas lâminas histológicas com células de Langerhans de pâncreas sabidamente positivas para Sinaptofisina e Cromogranina A.

O controle interno negativo foi a ausência de coloração castanha no tecido linfático normal do linfonodo.

4.2.4 ORGANIZAÇÃO DOS DADOS

Os dados obtidos com a quantificação de todas as variáveis estudadas encontram-se dispostos na Tabela A1 E B1 (ANEXO A e B).

As variáveis clínicas e histopatológicas consideradas foram as seguintes: gênero, idade no momento do ato operatório, tipo de ressecção, localização do tumor em relação à carina (central ou periférico), comprometimento da margem cirúrgica, dimensões do tumor (maior diâmetro), estadiamento TNM segundo a UICC ²⁴, ocorrência de metástases linfonodais bem como quantidade de linfonodos acometidos por neoplasia em relação ao total dissecado, e/ou à distância (local do acometimento e tempo de seguimento livre de doença), sobrevivência ou ocorrência de óbito e presença ou ausência de micrometástases.

4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa SPSS versão 17.0 (SPSS Inc; Illinois, USA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

Os testes estatísticos para a comparação entre as amostras, além da escolha das medidas de tendência central e dispersão dos valores que compõem as mesmas foram baseados nos tipos de distribuição. As distribuições foram consideradas paramétricas ou não segundo os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov seguido da correção de significância de Lilliefors.

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para as categorizadas utilizou-se frequências absolutas e relativas ⁶⁶.

Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais utilizou-se o teste “t” de Student, e entre as médias de três ou mais populações a comparação foi realizada pela análise de variância (ANOVA), com aplicação do teste auxiliar de Bonferroni ^{67, 68}.

Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas pela aplicação do teste exato de Fisher.

Para a verificação de existência de correlação entre duas variáveis com distribuição não-paramétrica, utilizou-se o teste de Mann-Whitney ^{67, 68}.

Utilizou-se análise multivariada por regressão logística, em degraus, para a exploração de correlação entre múltiplas variáveis independentes candidatas a predizerem o fenômeno de micrometástases, tendo como evento binário a ser predito a ocorrência de micrometástase ⁶⁹. O coeficiente beta (β) representa a magnitude da correlação. Todas as equações possíveis contém uma constante, que representa o risco de um indivíduo que não apresente qualquer das eventuais variáveis preditivas do evento binário.

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

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

4.2.6 ÍNDICE DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE MICROMETÁSTASE

4.2.6.1 ÍNDICE DE RISCO COM BASE NA ANÁLISE MULTIVARIADA

Utilizou-se a análise multivariada por regressão logística para a verificação da possibilidade de se estabelecer um índice numérico de risco para a ocorrência de metástase em pacientes com tumor carcinóide típico caso houvesse presença de variáveis preditivas de micrometástase na análise univariada. O evento binário micrometástase x não micrometástase foi definido como fenômeno a ser estudado.

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

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

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

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

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

4.2.6.2 PROPOSTA DE UM MODELO SIMPLIFICADO PARA ÍNDICE DE RISCO

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

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

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

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

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

Após o estabelecimento do valor máximo e mínimo, classificou-se todos os pacientes em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto. Para tal, utilizou-se a divisão dos 49 doentes em quartis, segundo o valor dos índices obtidos para a população. O primeiro quartil foi representado pelos pacientes com os menores valores para o índice, o quarto quartil, aqueles com os maiores.

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

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

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Para facilitar a compreensão dos resultados, estes serão dispostos inicialmente como o resultado referente à análise descritiva dos dados demográficos, anatomopatológicos, cirúrgicos e de biomarcadores de toda a população amostral estudada, independentemente de pertencerem ao grupo de pacientes sem qualquer metástase ou a algum dos grupos de pacientes que sofreram algum tipo de metástase linfática.

Posteriormente será realizada comparação entre os grupos sem e com macrometástases, comparação entre os grupos sem e com macrometástases/grupos de células tumorais, comparação entre os grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática (macrometástase, grupo de células tumorais e células tumorais isoladas) e por último a comparação entre o grupo sem e com micrometástase.

Finalmente será realizada análise multivariada por regressão logística para se determinar a real influência de cada variável em relação às micrometástases dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares.

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS, CIRÚRGICOS E BIOMARCADORES DA CASUÍSTICA GERAL

5.1.1 TESTE DE PARAMETRICIDADE

As quatro variáveis contínuas estudadas foram: a idade dos pacientes no momento da operação, o diâmetro do maior eixo do tumor, o número de linfonodos ressecados por paciente e o número de linfonodos acometidos por macrometástase.

A idade dos pacientes teve distribuição considerada paramétrica segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,782$, bi-caudado). Mesmo quando aplicados os testes de Shapiro-Wilk e de Correção de Significância de Lilliefors, a idade permaneceu identificada como uma variável com valores distribuídos de forma paramétrica ($p=0,07$ e $p=0,2$ respectivamente).

O diâmetro do maior eixo do tumor foi considerado paramétrico no teste de parametricidade de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,295$), porém não permanece classificado como tal quando aplicados os testes de Shapiro-Wilk e de Correção de Significância de Lilliefors ($p=0,002$, e $p=0,018$ respectivamente).

Considerando-se as variáveis relacionadas à análise dos linfonodos, tanto a quantidade de linfonodos ressecados por paciente quanto o número de linfonodos acometidos por macrometástase foram considerados variáveis com distribuição não paramétrica.

O total de linfonodos positivos por paciente foi considerado como uma variável não paramétrica já no teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,0001$).

A variável total de linfonodos dissecados por paciente foi considerada como tendo dados parametricamente distribuídos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,067$), porém não permaneceu assim considerada quando aplicados os testes de Shapiro-Wilk e o teste de Correção de Significância de Lilliefors ($p=0,0001$ e $p=0,0001$ respectivamente).

5.1.2 DADOS DEMOGRÁFICOS DA CASUÍSTICA GERAL – ANÁLISE DESCRITIVA

Antes de se proceder à descrição dos resultados dos testes estatísticos, serão descritas as características demográficas e anatomopatológicas referentes a todos os pacientes incluídos e a todos os tumores ressecados.

5.1.2.1 GÊNERO

A casuística geral foi composta por 19 homens (38,8%) e 30 mulheres (61,2%), na proporção de 2:3, respectivamente (Figura 7).

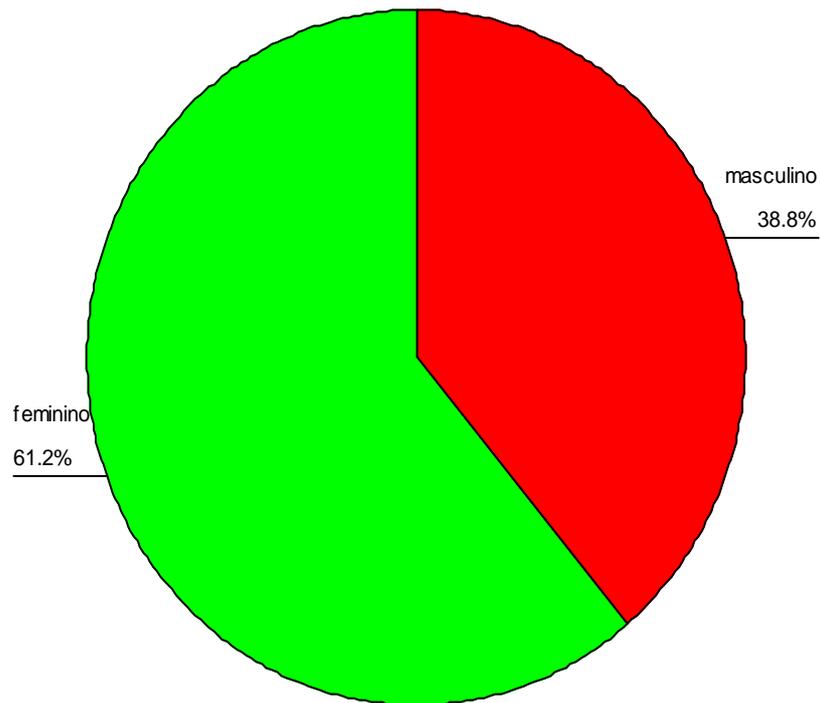


Fig. 7 – Gráfico de distribuição do Gênero

5.1.2.2 IDADE

A idade dos pacientes da casuística geral variou entre 17 e 77 anos, com média de 41,3; erro padrão da média no intervalo de confiança a 95% de 2,3 e desvio padrão de 15,9 anos (Tabela 2 e Figura 8).

Tabela 2 – Análise de média, erro padrão da média, intervalo de confiança e desvio padrão da variável Idade

	Mínima	Máxima	Média	Erro padrão	Desvio padrão
Idade	17	77	41,27	2,27	15,88

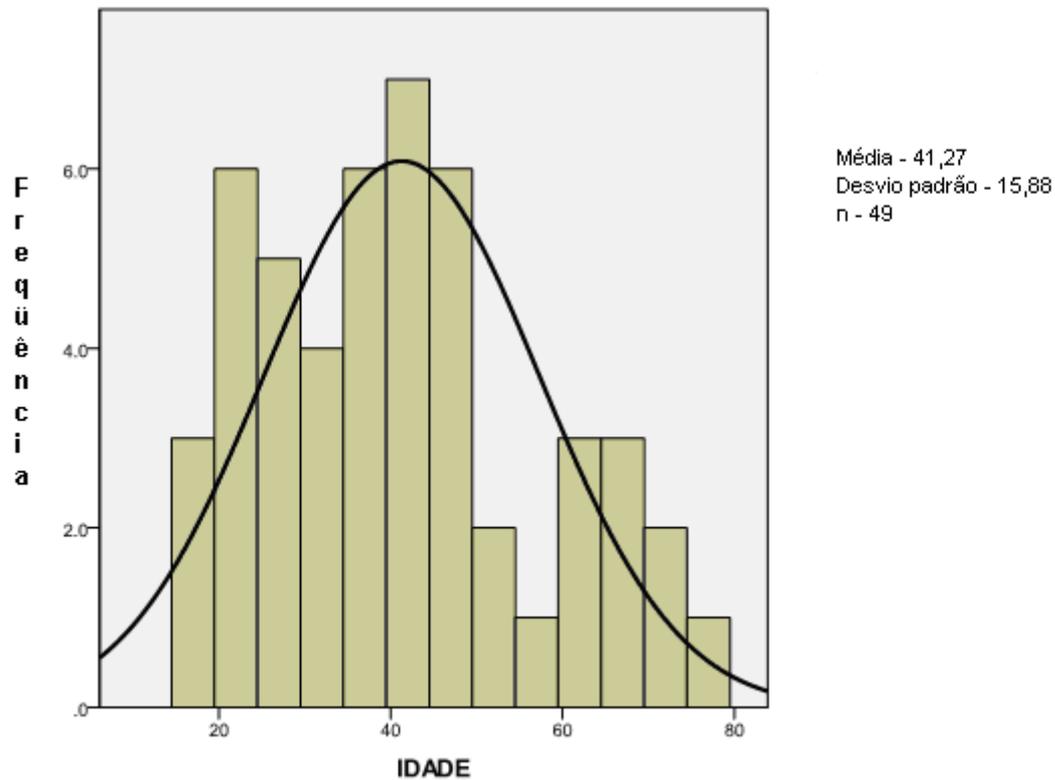


Fig. 8 – Gráfico da frequência de casos pela idade (distribuição paramétrica)

5.1.3 DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS – ANÁLISE DESCRITIVA

5.1.3.1 LOBO ACOMETIDO PELO TUMOR

Os lobos acometidos pelo tumor carcinóide típico broncopulmonar expressos através de sua porcentagem encontram-se detalhados no gráfico a seguir (Figura 9).

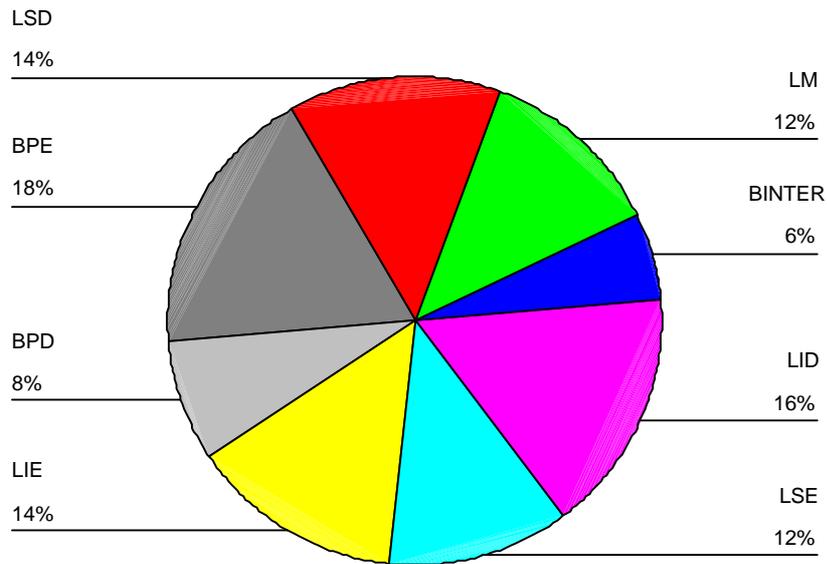


Fig. 9 – Gráfico da distribuição da localização do tumor no pulmão.

SIGLA	LOCAL
LSD	Lobo superior direito
LID	Lobo inferior direito
LM	Lobo médio
LSE	Lobo superior esquerdo
LIE	Lobo inferior esquerdo
BPD	Brônquio principal direito
BPE	Brônquio principal esquerdo
BINTER	Brônquio intermédio

5.1.3.2 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA DO TUMOR

Em relação às vias aéreas, 38/49 dos tumores (78%) eram centrais e 11/49 (22%) eram periféricos (Figura 10).

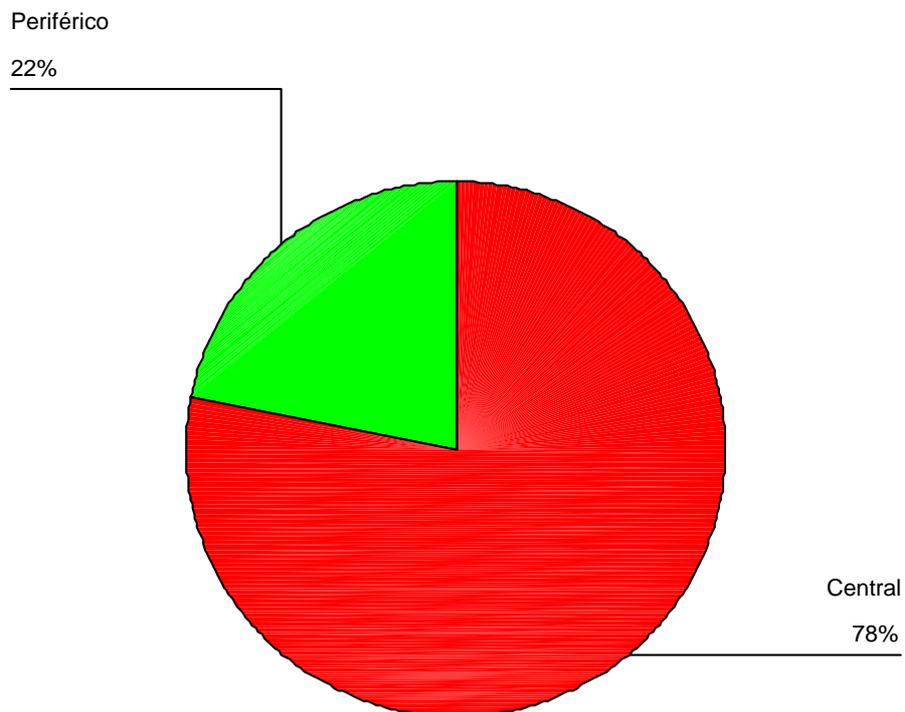


Fig. 10 – Gráfico da distribuição central ou periférica dos tumores carcinóides broncogênicos

5.1.3.3 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO NA CASUÍSTICA GERAL

O diâmetro do maior eixo do tumor primário dos 49 pacientes variou de cinco a 80 milímetros, com mediana de 25 e intervalo interquartil 25 a 75% entre 16 e 35 milímetros. É válido lembrar ao leitor que abaixo de cinco milímetros, por definição da Organização Mundial de Saúde, a proliferação neuroendócrina neoplásica (e não hiperplásica) é definida como “Tumorlet” e não mais como tumor carcinóide típico (Figura 11).

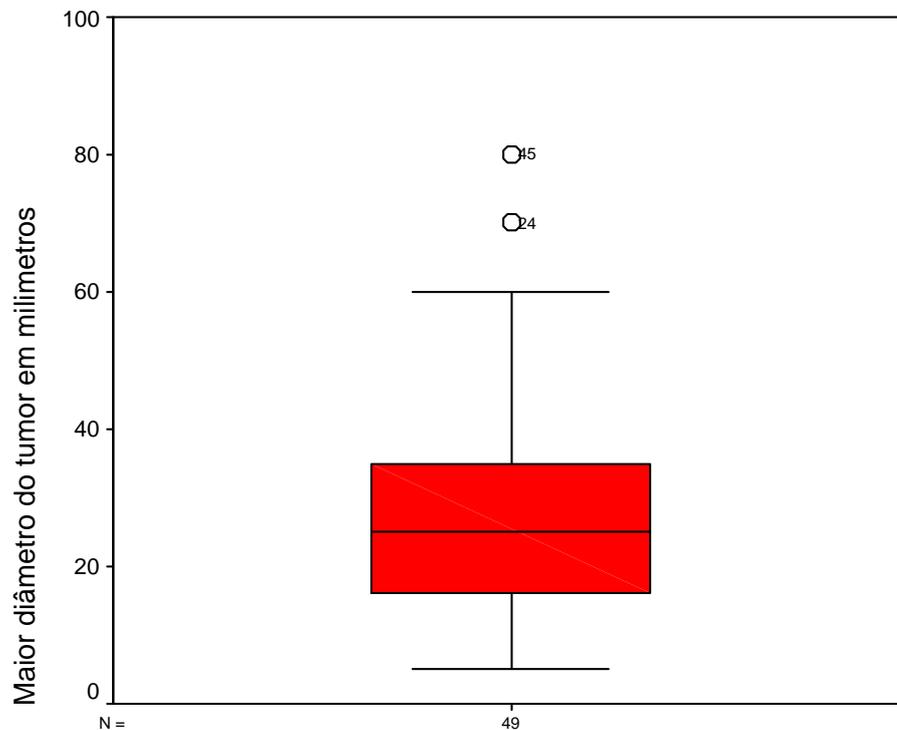


Fig. 11 – Gráfico da avaliação do maior diâmetro do tumor

5.1.3.4 ESTADIAMENTO T

Em relação ao estadiamento T, os tumores carcinóides apresentaram a seguinte distribuição: T1 (44%), T2 (32%), T3 (18%) e T4(6%) (Figura 12).

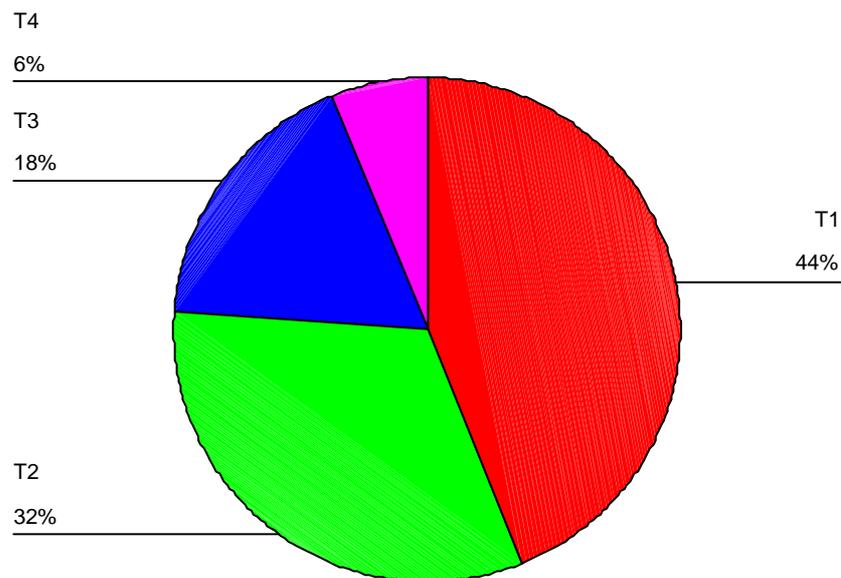


Fig. 12 - Gráfico da distribuição do estadiamento T

5.1.4 DADOS CIRÚRGICOS – ANÁLISE DESCRITIVA

5.1.4.1 RESSECÇÃO PULMONAR REALIZADA

As ressecções pulmonares utilizadas para o tratamento dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares estão representadas na figura abaixo (Figura 13).

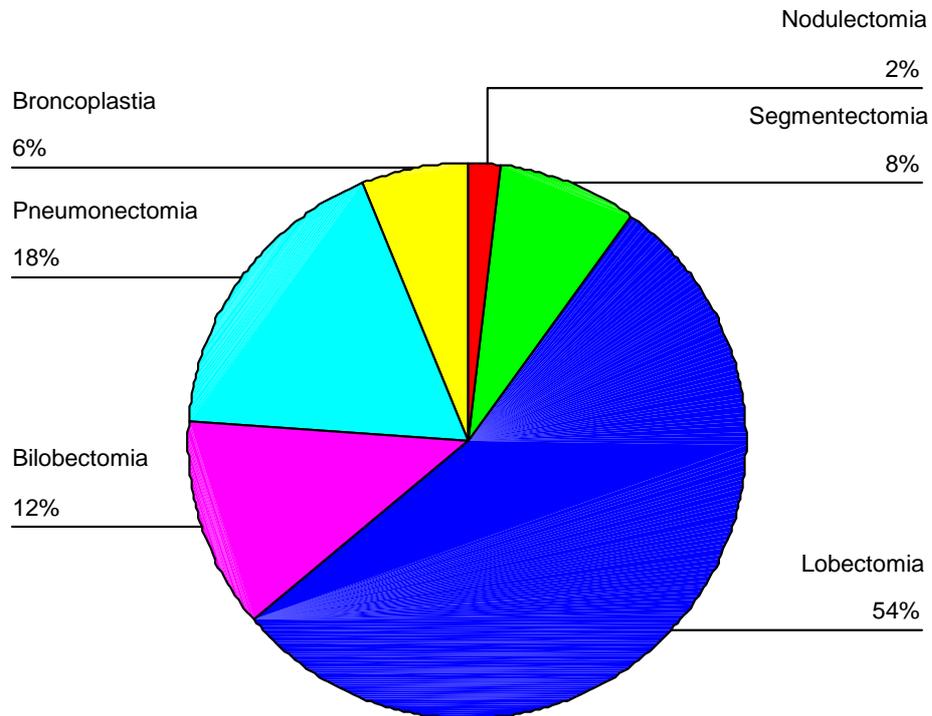


Fig. 13 – Gráfico das ressecções pulmonares realizadas

5.1.4.2 MARGEM CIRÚRGICA ACOMETIDA POR TUMOR

Em relação à margem cirúrgica, houve um total de seis dos 49 casos (12%) de pacientes com comprometimento da mesma por células do tumor carcinóide típico (Figura 14).

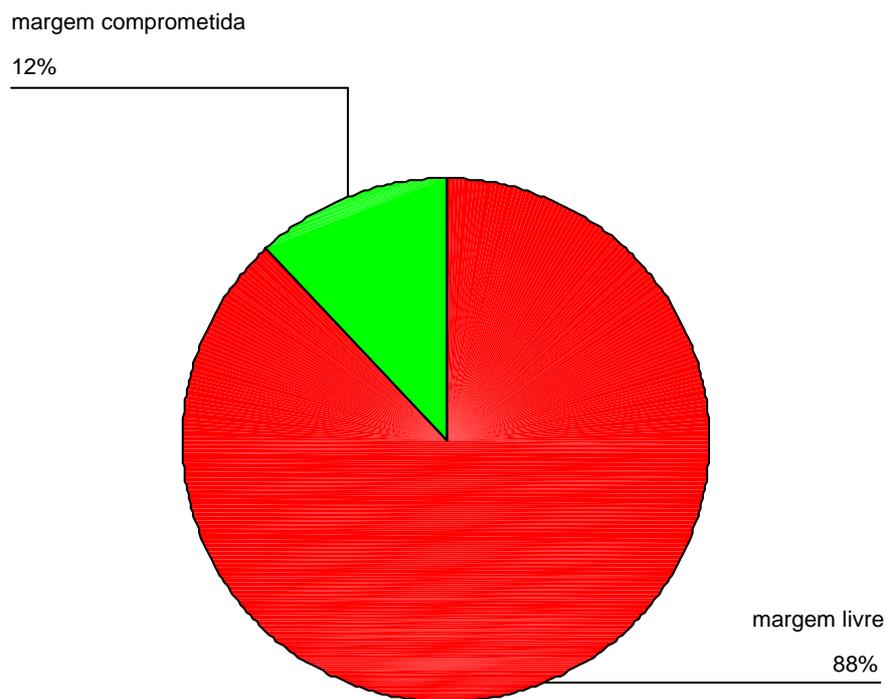


Fig. 14 – Gráfico de avaliação da margem cirúrgica comprometida

5.1.4.3 QUANTIDADE DE LINFONODOS RESSECADOS POR PACIENTE

A quantidade de linfonodos ressecados no ato operatório do tumor carcinóide típico, por paciente, variou de 2 a 24 linfonodos, a mediana foi de 6, com intervalo interquartil 25-75% entre 3,5 e 11,5 linfonodos.

5.1.4.4 QUANTIDADE DE LINFONODOS ACOMETIDOS POR MACROMETÁSTASE POR PACIENTE

A quantidade de linfonodos acometidos por macrometástase por paciente variou de zero (pacientes do grupo denominado “sem macrometástase linfática” a três, com mediana de zero e o intervalo interquartil 25-75% permaneceu em zero (Figura 15).

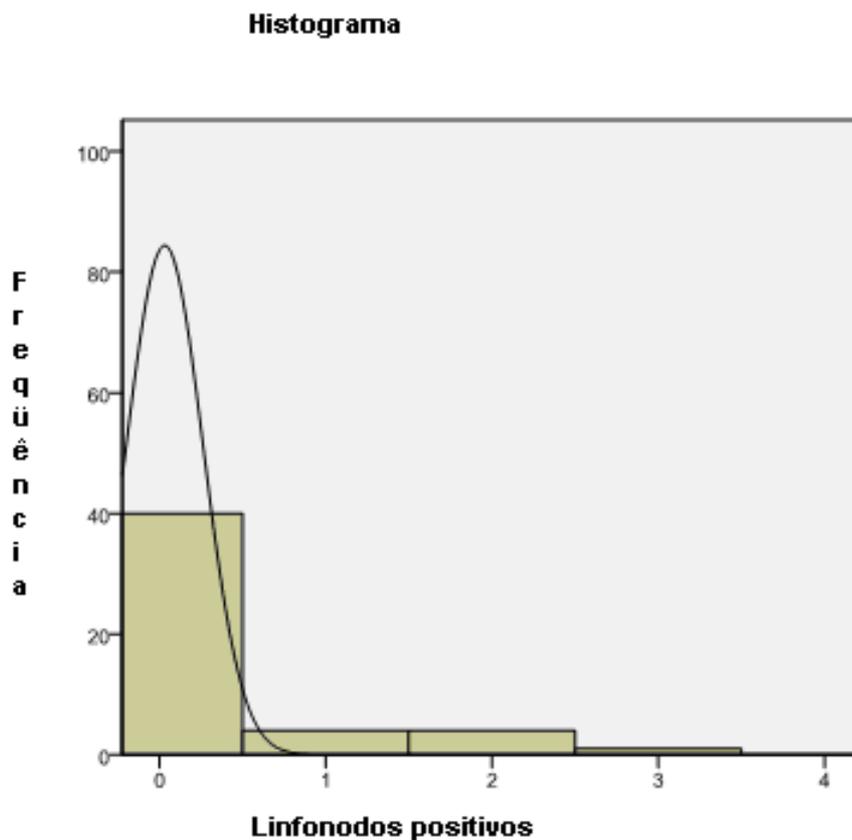


Fig. 15 – Gráfico de avaliação de linfonodos acometidos por macrometástase.

5.1.5 BIOMARCADORES – ANÁLISE DESCRITIVA

Recorda-se que a análise descritiva dos biomarcadores Sinaptofisina e Cromogranina A foi realizada para se verificar a hipótese de número 1, que é a hipótese de que existe ou não o fenômeno de micrometástases nos tumores carcinóides típicos broncopulmonares.

Além disso, também complementa a mesma hipótese, de que os biomarcadores Sinaptofisina e Cromogranina A podem identificar células neoplásicas provindas dos tumores carcinóides típicos em linfonodos considerados livres de células malignas quando analisados rotineiramente apenas com a coloração tradicional de hematoxilina-eosina.

5.1.5.1 SINAPTOFISINA OU CROMOGRANINA A

Antes de o leitor iniciar a análise deste item, é didático que já saiba que em alguns casos pode haver imunomarcação por apenas um destes biomarcadores, enquanto outros linfonodos serão imunomarcados por ambos.

Em 21 dos 49 casos (42,8%) estudados houve imunomarcação por pelo menos um dos biomarcadores Sinaptofisina ou Cromogranina A, de células malignas em linfonodos previamente diagnosticados como negativos para a presença dessas células quando foram analisados apenas pela coloração tradicional de hematoxilina-eosina.

Dentre os nove casos que já se sabia desde o ato operatório que havia pelo menos um linfonodo ressecado acometido por macrometástase, ao serem analisados os outros linfonodos ressecados no mesmo ato, mas anteriormente

considerados como negativos ao exame tradicional de coloração apenas pela hematoxilina-eosina, quatro (44,4%) foram marcados também para micrometástases. Os outros cinco casos permaneceram classificados como não portando qualquer subtipo adicional de metástase linfática, pois não tiveram qualquer imunomarcção nesses linfonodos adicionais.

Os quatro casos específicos de pacientes que além de já possuírem o diagnóstico prévio de macrometástase ao exame anatomopatológico convencional pela coloração tradicional de hematoxilina-eosina, ainda tiveram o diagnóstico adicional de micrometástase porque foram imunomarcados durante este estudo, em três casos as micrometástases foram marcadas por ambos os marcadores e em um caso, somente por um dos imunomarcadores.

A Sinaptofisina marcou mais micrometástases em linfonodos do que a Cromogranina A, como será exposto a seguir.

5.1.5.2 SINAPTOFISINA

Em 19 dos 49 (38,7%) casos houve imunomarcção pela Sinaptofisina.

Em 17 destes 19 casos (89,4%), demonstrou-se células tumorais isoladas, em seis (31,5%) demonstrou-se grupo de células malignas. Em 14 casos a sinaptofisina foi a única marcação, sendo essas células negativas à marcação pela Cromogranina A (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de micrometástases coradas por Sinaptofisina

	Frequência	Porcentagem
Grupos de células	6	31,5%
Células tumorais isoladas	17	89,4%
Total	19	100%

5.1.5.3 CROMOGRANINA A

Em sete dos 49 casos (14,3%) houve imunomarcção pela Cromogranina A. Em cinco casos dentre os sete (71,4%) demonstrou-se célula tumoral isolada, enquanto em quatro casos (57,1%) demonstrou-se grupo de células. Somente em dois casos houve imunomarcção exclusiva pela Cromogranina A, não o sendo pela Sinaptofisina (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência de micrometástases coradas pela Cromogranina A

	Frequência	Porcentagem
Grupos de células	4	57,1%
Células tumorais isoladas	5	71,4%
Total	7	100%

5.1.5.4 SINCRONIA DE SINAPTOFISINA E CROMOGRANINA A (DUPLA MARCAÇÃO)

Vale lembrar que é considerada imunomarcção síncrona quando em uma mesma região do linfonodo ocorre coloração por ambos os marcadores com o mesmo padrão de micrometástase, mas isso não sugere que seja exatamente a mesma célula isolada corada.

Considera-se que houve dupla marcação de uma mesma célula somente nos casos em que se observa um grupo de células tumorais, pois determinar que uma célula isolada positiva para um determinado marcador é exatamente a mesma célula corada pelo outro é uma tarefa que pode induzir à interpretação passível de erro.

Cinco dos 21 casos (23,8%) imunomarcados tiveram dupla marcação: os casos identificados pelos números 12, 33, 45, 47 e 49.

5.2 DADOS REFERENTES À OCORRÊNCIA DE MACROMETÁSTASES E MICROMETÁSTASES LINFÁTICAS E HEMATOGENICAS

5.2.1 ACOMETIMENTO POR MACROMETÁSTASE OU MICROMETÁSTASE LINFÁTICA

Pelo menos um tipo de metástase linfática (macrometástase, grupo de células tumorais ou célula tumoral isolada) foi identificada em 26 (53,0%) dos 49 pacientes da casuística.

5.2.2 ACOMETIMENTO POR MACROMETÁSTASE LINFÁTICA

Macrometástases foram diagnosticadas em nove (18,4%) dos 49 pacientes da casuística. É válido lembrar ao leitor que macrometástase foi definida pela análise tradicional baseada apenas na coloração convencional por hematoxilina-eosina. Nenhuma macrometástase que não tenha sido já detectada pelo exame tradicional foi detectada somente pela análise imuno-histoquímica.

5.2.3 ACOMETIMENTO POR MICROMETÁSTASE LINFÁTICA

Algum dos subtipos de micrometástase linfática foi diagnosticado em 21 (42,8%) dos 49 pacientes. Em dezoito pacientes (36,7%) foram encontrados células tumorais isoladas. Em sete (14,3%) foram encontrados grupos de células tumorais, sendo que quatro destes, os pacientes identificados pelos números seqüenciais de inclusão 8, 23, 33 e 47, houve concomitância dos dois subtipos de micrometástases. Estes três últimos pacientes tiveram concomitância de todos os três subtipos de metástases estudadas (células tumorais isoladas, grupos de células tumorais e macrometástase).

5.2.4 ACOMETIMENTO CONCOMITANTE DE MICRO E MACROMETÁSTASE

Conforme descrito acima, os pacientes identificados pelos números 23, 33 e 47 tiveram concomitância de todos os três tipos de metástases.

Já o paciente identificado pelo número 16 teve concomitância de macrometástase e de acometimento linfático por célula tumoral isolada, sem acometimento por grupo de células.

5.2.5 OCORRÊNCIA DE METÁSTASE HEMATOGENICA DURANTE O ACOMPANHAMENTO PÓS-OPERATÓRIO

Houve um caso de metástase hematogênica para o terço distal do fêmur direito. O diagnóstico foi feito em 05/12/1997 durante o estadiamento pré-operatório. O paciente foi operado em 02/03/1998 devido a quadro de hemoptise por tumor endobrônquico no brônquio principal esquerdo. Foi realizada uma ressecção em manga do brônquio, com anastomose término-terminal. Não foi possível a retirada completa do tumor e a margem cirúrgica ficou comprometida. Também foi diagnosticada metástase linfática durante a operação (Figura 16).

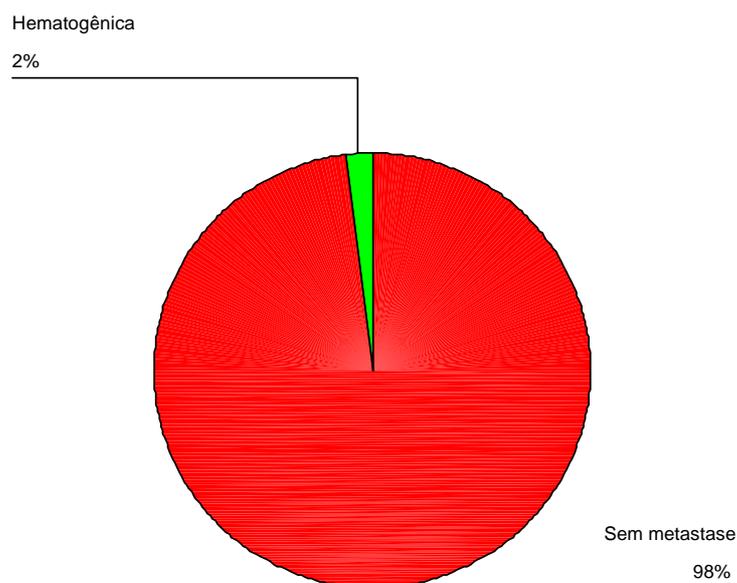


Fig. 16 – Gráfico de ocorrência de metástase hematogênica no pós-operatório.

5.3 ÓBITOS

Em nossa casuística houve seis óbitos, sendo quatro não relacionados à metástases (casos 11, 19, 38 e 45) e dois casos (casos 16 e 49) secundários à neoplasia.

O primeiro é JS, francesa, operada aos 71 anos, com tumor periférico de 25mm de diâmetro, margem livre, sem metástase linfática em 6 linfonodos dissecados. Não foram demonstradas micrometástases no estudo. Foi operada em 06/11/2002 e óbito em 14/1/2004 aos 72 anos por doença de Creutzfeldt-Jakobs.

O segundo óbito é JVS, brasileira, operada quando aos 18 anos com tumor central de 30mm de diâmetro, margem livre, com metástase linfática em 1 de 20 linfonodos dissecados. Foram demonstradas células tumorais isoladas no estudo. Foi operada em 17/10/83 e foi a óbito em 19/10/83 por complicações pós-operatórias (sepse).

O terceiro óbito é NNB, brasileiro, operado aos 62 anos com tumor central de 30mm de diâmetro, margem livre, sem metástase linfática em 12 linfonodos dissecados. Não foram demonstradas micrometástases no estudo. Foi operado em 03/06/85 e foi a óbito em 01/6/99 aos 76 anos por infarto agudo do miocárdio.

O quarto óbito é OS, brasileiro, operado aos 46 anos com tumor central de 20mm de diâmetro, margem comprometida, com metástase linfática em 2 linfonodos de 4 dissecados. Não foram demonstradas micrometástases no estudo. Foi operado em 02/03/98 e foi a óbito em 31/03/2000 aos 48 anos por infarto agudo do miocárdio.

O quinto óbito foi AASM, brasileira, operada aos 61 anos com tumor central de 80mm de diâmetro, margem não comprometida, sem linfonodos comprometidos de 2 dissecados. Foram demonstradas células tumorais isoladas no estudo. Foi operada em 26/04/1995 e foi a óbito em 03/01/2010 aos 76 anos por sepse devido a pneumonia bacteriana aguda da comunidade provavelmente por imobilidade devido à doença de Alzheimer.

O sexto óbito foi AMS, brasileira, operada aos 42 anos com tumor central, margem comprometida, sem linfonodos comprometidos de 13 dissecados. Foram demonstradas células tumorais isoladas no estudo. Foi operada em 22/2/2000 e foi a óbito em 17/08/2000 por obstrução de via aérea por torção de endoprótese colocada para correção de corrosão extensa de esôfago, traquéia, carina e brônquio principal esquerdo provocada pelo tumor.

5.4 ANÁLISE UNIVARIADA

Quatro baterias de testes distintas serão realizadas quanto às comparações entre o grupo de doentes com e sem metástase.

Inicialmente serão comparados o grupo de pacientes que apresentaram somente macrometástase (independente de terem ou não qualquer subtipo de micrometástase) e aqueles que não apresentaram macrometástase (também sem considerar o fenômeno de micrometástase).

Em seguida será adicionado ao grupo de pacientes com macrometástase aqueles que apresentaram também micrometástase por grupo de células tumorais. Nesta segunda bateria de testes não serão ainda inclusos os pacientes que apresentaram apenas micrometástase por célula tumoral isolada.

Uma terceira bateria de testes será realizada considerando-se dois grupos de pacientes: aqueles com algum subtipo de metástase linfática, seja macro ou micro, e outro grupo composto por pacientes que não tiveram qualquer subtipo de metástase.

Finalmente será realizada uma quarta bateria de testes considerando-se o grupo de pacientes sem e com qualquer tipo de micrometástase.

5.4.1 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM MACROMETÁSTASE

Para que a leitura seja mais confortável, será lembrado ao leitor qual a hipótese que gerou a necessidade de cada teste estatístico. Também lembramos ao leitor que ocorreram ao todo nove macrometástases em 49 casos nesta população amostral.

5.4.1.1 IDADE

A hipótese verificada é a de que pacientes mais idosos teriam mais macrometástase que os mais jovens.

A média da idade dos pacientes sem macrometástase foi de 41,7 anos, com desvio padrão de 16,1 e erro padrão da média de 2,5. Para os pacientes que sofreram macrometástase, a média de idade foi menor, de 39,3 anos, com desvio padrão de 15,4 anos e erro padrão da média de 5,1 (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação das médias de idade entre os grupos de pacientes sem e com macrometástase pelo teste t de Student

Idade	Número de casos	Média	Desvio padrão	Erro padrão
Sem macrometástase	40	41,70	16,14	2,55
Com macrometástase	9	39,33	15,44	5,14

p = 0,69

Não houve diferença das médias de idade entre os grupos de pacientes sem e com macrometastatástase (teste t de Student não pareado bicaudado, assumindo-se a igualdade de variância, $p=0,691$).

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a prever o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.2 GÊNERO

A hipótese verificada é a de que os homens são mais acometidos por macrometástase que as mulheres. Cinco dos 19 homens (26,3%) foram acometidos por macrometástase, enquanto quatro das 30 mulheres (13,3%) o foram.

Apesar da frequência de macrometástase nesse grupo de homens ter sido o dobro daquela observada no grupo de mulheres, não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição por gênero dos pacientes entre os grupos sem e com macrometástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,28$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação da frequência de macrometástase por gênero pelo teste exato de Fisher

Gênero	Sem macro	Com macro	Total
Masculino	14	5	19
Feminino	26	4	30
Total	40	9	49

p = 0,28

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.3 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA DO TUMOR

A hipótese verificada é a de que os tumores periféricos têm maior potencial de gerar macrometástase que os centrais.

Observou-se, porém, que houve nesta população amostral, em números absolutos, exatamente o inverso. Oito dos 38 tumores centrais (21,1%) geraram macrometástases e um dos 11 periféricos (9,1%) também o fizeram.

Portanto, não houve diferença entre a distribuição por localização do tumor em posição central às vias aéreas superiores ou periféricos no parênquima pulmonar entre os grupos sem e com macrometástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,66$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação da frequência de localização central ou periférica dos tumores entre os grupos sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher

Localização	Sem macro	Com macro	Total
Central	30	8	38
Periférico	10	1	11
Total	40	9	49

P = 0,66

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.4 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO DO TUMOR

A hipótese verificada é a de que tumores maiores têm maior probabilidade de gerar macrometástase.

O maior diâmetro dos tumores primários que não geraram macrometástase variou entre cinco e 80 milímetros; tiveram diâmetro mediano de 22,5 milímetros e intervalo entre os quartis 25 e 75% entre 16,3 e 35 milímetros. Considerando-se os tumores que geraram macrometástase, o maior diâmetro variou de cinco a 60 milímetros, com mediana de 24,2 milímetros e intervalo inter-quartis 25 a 75% entre 12,5 e 35 milímetros.

Em conclusão, não houve diferença entre o diâmetro do maior eixo do tumor entre os grupos de pacientes que tiveram e não tiveram macrometástase (Teste de Mann-Whitney bicaudado, $p=0,86$) (Tabela 8)

Tabela 8 – Comparação da mediana do maior diâmetro do tumor de pacientes sem e com macrometástase pelo teste de Mann-Whitney

Macrometástase	N	Mediana	Soma dos Ranques
Sem	40	25,16	1006,5
Com	9	24,28	218,5
Total	49		

p = 0,86

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a prever o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.5 MARGEM CIRÚRGICA ACOMETIDA POR TUMOR

A hipótese verificada é a de que tumores que não puderam ser ressecados completamente e tiveram células remanescentes na margem cirúrgica foram os teoricamente mais invasivos, os quais teriam maior capacidade de comprometer tecidos adjacentes, e portanto teriam maior capacidade de gerar macrometástase.

Não houve diferença quanto à frequência de margem cirúrgica comprometida por células malignas quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase (Teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,067$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação da frequência de margem cirúrgica acometida pelo tumor em pacientes sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher

Margem comprometida	Sem macro	Com macro	Total
Sem margem	37	6	43
Com margem	3	3	6
Total	40	9	49

p = 0,067

Porém, o $p < 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.6 PRESENÇA DE MICROMETÁSTASE

A hipótese verificada foi a de que tumores que geram macrometástase nos linfonodos têm maior probabilidade também de enviarem células malignas para outros linfonodos que serão diagnosticadas na forma de algum subtipo de micrometástase. Em última análise a hipótese é de que as micrometástases sejam apenas macrometástases ainda com diâmetros exíguos.

Para relembrar o leitor, os linfonodos que já tinham sido inicialmente classificados como acometidos por macrometástase ao exame pela hematoxilina-eosina não foram reexaminados para verificar uma eventual concomitância, no mesmo linfonodo, da presença de algum tipo de micrometástase; somente linfonodos inicialmente classificados como sem macrometástase foram submetidos à coloração imunohistoquímica.

Cinco dos 28 (17,9%) casos sem qualquer micrometástase tiveram macrometástase; fenômeno equiparável foi observado no grupo de pacientes que tiveram algum dos tipos ou mesmo os dois subtipos de micrometástases: quatro dos 21 (19%) pacientes tiveram macrometástase.

Não houve diferença quanto à frequência de micrometástase quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase (Teste exato de Fisher bicaudado, $p=1$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação da frequência de micrometástase em pacientes sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher

Qualquer micrometástase	Sem macro	Com macro	Total
Sem micro	23	5	28
Com micro	17	4	21
Total	40	9	49

p = 1,0

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.7 METÁSTASE HEMATOGENICA

A hipótese verificada foi a de que tumores que têm capacidade de alcançar os linfonodos e de obter sucesso no estabelecimento de colônias de

células malignas nessas estruturas, também teriam maior capacidade de gerar metástase por via hematogênica.

O único paciente que tinha metástase hematogênica diagnosticada no período pré-operatório, na porção distal do fêmur três meses antes da operação do pulmão, também teve macrometástase linfática para o mediastino.

Oito entre os 48 (16,7%) pacientes sem metástase hematogênica tiveram macrometástase linfática.

Não houve diferença quanto à frequência de metástase hematogênica quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase (Teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,18$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com macrometástase pelo teste exato de Fisher

Metástase hematogênica	Sem macro	Com macro	Total
Sem meta	40	8	48
Com meta	0	1	1
Total	40	9	49

p = 0,18

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.1.8 RESUMO DAS ANÁLISES DOS GRUPOS SEM E COM MACROMETÁSTASE

Tabela 12 – Resumo das análises dos grupos sem e com macrometástase

	p
Idade	0,69
Gênero	0,28
Localização central ou periférica	0,66
Diâmetro do maior eixo do tumor	0,86
Margem cirúrgica acometida	0,067
Micrometástase	1,0
Metástase hematogênia	0,18

Houve à análise univariada apenas uma variável candidata a ser preditiva do fenômeno binário “presença/ ausência de macrometástase”, por isso o modelo de regressão logística não foi testado.

5.4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS SEM E COM MACROMETÁSTASE/ GRUPO DE CÉLULAS TUMORAIS

As hipóteses a serem verificadas já foram lembradas ao leitor no ítem anterior.

5.4.2.1 IDADE

A idade no grupo sem macrometástase e/ou grupo de células malignas variou entre 17 e 77 anos. A média de idade nesse grupo foi de 41 anos, com desvio-padrão de 15,6 anos e erro padrão da média de 2,6. Considerando-se o grupo de pacientes com macro e/ou grupo de células malignas nos linfonodos ressecados, a idade variou entre 18 e 69 anos; a média foi de 42 anos, desvio-padrão de 17,2 anos e erro padrão da média de 4,8.

Desta forma não houve diferença estatisticamente significativa das médias de idade entre os grupos de pacientes sem e com macrometastátase/ grupo de células tumorais (teste t de Student não pareado bicaudado, $p=0,85$)(Tabela 13).

Tabela 13 – Comparação das médias de idade entre pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste t de Student

Idade	Número de casos	Média	Desvio padrão	Erro padrão
Sem macrometástase/ grupo de células	36	41	15,6	2,6
Com macrometástase/ grupo de células	13	42	17,1	4,7
p = 0,85				

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase/ grupo de células tumorais no modelo de regressão logística.

5.4.2.2 GÊNERO

Cinco dos 19 homens (26,3%) tiveram macrometástase e/ou grupo de células tumorais em seus linfonodos ressecados, enquanto oito das 30 mulheres (26,7%) tiveram esse acometimento.

Desta forma não houve diferença entre a distribuição por gênero dos pacientes entre os grupos sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais (teste exato de Fisher bicaudado, $p=1.0$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação da frequência de macrometástase/ grupo de células tumorais por gênero pelo teste exato de Fisher

Gênero	Sem macro/ grupo de células	Com macro/ grupo de células	Total
Masculino	14	5	19
Feminino	22	8	30
Total	36	13	49

p = 1,0

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase/ grupo de células tumorais no modelo de regressão logística.

5.4.2.3 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA DO TUMOR

Nove dos 38 (23,7%) tumores centrais e quatro dos 11 tumores periféricos (36,4%) enviaram macrometástases e/ou grupo de células malignas para os linfonodos.

Esta diferença entre a distribuição por localização central ou periférica entre os grupos sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais não foi estatisticamente significativa (teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,45$) (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparação da frequência de localização central ou periférica do tumor entre os grupos sem e com macrometástases/ grupo de células tumorais pelo teste exato de Fisher

Localização	Sem macro/ grupo de células	Com macro/ grupo de células	Total
Central	29	9	38
Periférico	7	4	11
Total	36	13	49

p = 0,45

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase/ grupo de células tumorais no modelo de regressão logística.

5.4.2.4 MAIOR DIÂMETRO DO TUMOR

A mediana para os valores de maior diâmetro do tumor foi de 25mm, com intervalo inter-quartil 25 a 75% entre 15,5 mm e 35 mm. Os valores extremos variaram de cinco milímetros (lembra-se o leitor que tumores com diâmetros menores que cinco milímetros não preenchem os critérios de inclusão no estudo por serem arbitrariamente classificados como “Tumorlets”). Não houve diferença entre o diâmetro do maior eixo do tumor entre os grupos de pacientes que tiveram e não tiveram macrometástase/ grupo de células tumorais. (Teste de Mann-Whitney bicaudado, $p=0,31$) (Tabela 16).

Tabela 16 – Comparação da mediana do maior diâmetro do tumor de pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste de Mann-Whitney

Macrometástase/ grupo de células	N	Mediana	Soma dos Ranques
Sem	36	26,24	944,5
Com	13	21,58	280,5
Total	49		

p = 0,31

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase/ grupo de células tumorais no modelo de regressão logística.

5.4.2.5 MARGEM CIRÚRGICA COMPROMETIDA

Foi identificada uma diferença quanto à frequência de margem cirúrgica comprometida por células malignas quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais (Teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,036$). Entre os pacientes com margem cirúrgica negativa para células malignas, 9/43 pacientes (20,9%) apresentaram macro metástase/ grupo de células malignas, enquanto quatro dos seis pacientes com margem cirúrgica comprometida apresentaram ou macrometástase ou grupo de células neoplásicas no linfonodo (66,7%) (Tabela 17).

Tabela 17 – Comparação da frequência de margem cirúrgica comprometida pelo tumor em pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste t de Student

Margem comprometida	Sem macro/ grupo de células	Com macro/ grupo de células	Total
Sem margem	34	9	43
Com margem	2	4	6
Total	36	13	49

P = 0,036

O $p<0,1$ faz com que este resultado da análise univariada eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase/ grupo de células tumorais no modelo de regressão logística.

5.4.2.6 PRESENÇA DE MICROMETÁSTASE

Foi testada a hipótese de que pacientes com acometimento por macrometástase/ grupo de células tumorais também seriam mais acometidos pelo subtipo de micrometástase caracterizado pela presença de célula maligna isolada. Cinco dos 13 (38,5%) pacientes com macrometástase/ grupo de células tumorais tiveram também a presença de metástase linfática por célula isolada em outro linfonodo, valor parecido também foi obtido no outro grupo, pois 15 dos 36 (41,7%) pacientes que não tiveram nem macrometástase nem grupo de células malignas em seus linfonodos, tiveram a presença de metástase por célula isolada em algum linfonodo.

Dessa forma, não houve diferença quanto à frequência de micrometástases por célula tumoral isolada quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células malignas (Teste exato de Fisher bicaudado, $p=1,0$) (Tabela 18).

Tabela 18 – Comparação da frequência de micrometástase por célula tumoral isolada em pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais pelo teste exato de Fisher

Micrometástase	Sem macro/ grupo de células	Com macro/ grupo de células	Total
Sem micro	21	8	29
Com micro	15	5	20
Total	36	13	49

$p = 1,0$

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.2.7 METÁSTASE HEMATOGENICA

Não houve diferença quanto à frequência de metástase hematogênica quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células tumorais (Teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,26$) (Tabela 19).

Tabela 19 – Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com macrometástase/ grupo de células pelo teste exato de Fisher

Metástase hematogênica	Sem macro/ grupo de células	Com macro/ grupo de células	Total
Sem meta	36	12	48
Com meta	0	1	1
Total	36	13	49

p = 0,26

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.2.8 RESUMO DAS ANÁLISES DOS GRUPOS SEM E COM MACROMETÁSTASE/ GRUPO DE CÉLULAS TUMORAIS

**Tabela 20 – Resumo das análises dos grupos sem e com macrometástase/
grupo de células tumorais**

	p
Idade	0,85
Gênero	1,0
Localização central ou periférica	0,45
Diâmetro do maior eixo do tumor	0,31
Margem cirúrgica acometida	0,036
Micrometástase	1,0
Metástase hematogênia	0,26

Houve à análise univariada apenas uma variável candidata a ser preditiva do fenômeno binário “presença/ ausência de macrometástase/ grupos de células tumorais”, por isso o modelo de regressão logística não foi testado.

5.4.3 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM QUALQUER TIPO DE METÁSTASE LINFÁTICA (MACROMETÁSTASE, GRUPO DE CÉLULAS TUMORAIS E CÉLULAS TUMORAIS ISOLADAS)

5.4.3.1 IDADE

Apesar de ter sido detectada uma diferença das médias de idade entre os grupos de pacientes sem e com pelo menos um subtipo de metástase (teste t de Student não pareado bicaudado, $p=0,017$), não foi confirmada a hipótese auxiliar, pois a média de idade foi mais elevada no grupo de pacientes sem qualquer sub tipo de metástase (Tabela 21).

Tabela 21 – Comparação das médias de idade entre pacientes sem e com qualquer tipo de metástase linfática pelo teste t de Student

Idade	Número de casos	Média	Desvio padrão	Erro padrão
Sem qualquer metástase	21	46,95	15,27	3,33
Com qualquer metástase	28	36,32	14,52	2,74
p = 0,017				

O $p < 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.3.2 GÊNERO

Doze dos 19 homens (63,2%) tiveram algum subtipo de metástase, enquanto 16 das 30 mulheres (53,3%) também apresentaram tal fenômeno. Desta forma, não houve diferença entre a distribuição por gênero dos pacientes entre os grupos sem e com pelo menos um subtipo de metástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p = 0,56$) (Tabela 22).

Tabela 22 – Comparação entre as frequências de pacientes sem e com qualquer tipo de metástase linfática por gênero pelo teste exato de Fisher

Gênero	Sem qualquer tipo de meta	Com qualquer tipo de meta	Total
Masculino	7	12	19
Feminino	14	16	30
Total	21	28	49

p = 0,56

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.3.3 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA

Observou-se que 20 dos 38 tumores centrais e seis dos 11 tumores periféricos apresentaram algum subtipo de metástase nos linfonodos ressecados. Desta forma não foi detectada diferença entre a distribuição por posição central na via aérea superior ou periférica no parênquima pulmonar dos tumores entre os grupos dos pacientes com e sem pelo menos um subtipo de metástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=1$) (Tabela 23).

Tabela 23 – Comparação da frequência de localização central ou periférica do tumor entre os grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática pelo teste exato de Fisher

Localização	Sem qualquer tipo de meta	Com qualquer tipo de meta	Total
Central	18	20	38
Periférico	5	6	11
Total	23	26	49

$p = 1,0$

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.3.4 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO DO TUMOR

Não foi detectada diferença entre o diâmetro do maior eixo do tumor entre os grupos de pacientes que tiveram e não tiveram pelo menos um subtipo de metástase (Teste de Mann-Whitney bicaudado, $p=0,61$) (Tabela 24).

Tabela 24 – Comparação das medianas do diâmetro do maior eixo do tumor de pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste de Mann-Whitney

Qualquer metástase linfática	N	Mediana	Soma dos Ranques
Sem	21	26,19	550,0
Com	28	24,11	675,0
Total	49		

p = 0,61

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.3.5 MARGEM CIRÚRGICA COMPROMETIDA PELO TUMOR

Não houve diferença entre a distribuição, por presença de células malignas na margem de ressecção cirúrgica, dos pacientes entre os grupos sem e com pelo menos um subtipo de metástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,22$) (Tabela 25).

Tabela 25 – Comparação da frequência de margem cirúrgica comprometida pelo tumor em pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste exato de Fisher

Margem cirúrgica comprometida	Sem qualquer tipo de meta	Com qualquer tipo de meta	Total
Sem	22	21	43
Com	1	5	6
Total	23	26	49

p = 0,22

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.3.6 METÁSTASE HEMATOGENICA

Não houve diferença entre a distribuição por presença de metástase hematogênica no acompanhamento pré e pós-operatório dos pacientes entre os grupos sem e com pelo menos um subtipo de metástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=1,0$) (Tabela 26).

Tabela 26 – Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com qualquer tipo de metástase pelo teste exato de Fisher

Metástase Hematogênica	Sem qualquer tipo de meta	Com qualquer tipo de meta	Total
Sem meta	23	25	48
Com meta	0	1	1
Total	23	26	49

p = 1,0

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.3.7 RESUMO DAS ANÁLISES DOS GRUPOS SEM E COM QUALQUER TIPO DE METÁSTASE LINFÁTICA

Tabela 27 – Resumo das análises dos grupos sem e com qualquer tipo de metástase linfática

	p
Idade	0,017
Gênero	0,56
Localização central ou periférica	1,0
Diâmetro do maior eixo do tumor	0,61
Margem cirúrgica acometida	0,22
Metástase hematogênica	1,0

Houve à análise univariada apenas uma variável candidata a ser preditiva do fenômeno binário “presença/ ausência de qualquer tipo de metástase”, por isso o modelo de regressão logística não foi testado.

5.4.4 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM QUALQUER TIPO DE MICROMETÁSTASE LINFÁTICA (GRUPO DE CÉLULAS TUMORAIS E CÉLULAS TUMORAIS ISOLADAS)

5.4.4.1 IDADE

A média de idade do grupo sem micrometástase foi de 44,6 anos com desvio padrão de 16,1 anos e erro padrão da média de 3,0 anos. Considerando-se o grupo de pacientes com micrometástase nos linfonodos ressecados, a média de idade foi de 37 anos com desvio padrão de 14,8 anos e erro padrão de 3,2 anos (Tabela 28).

Tabela 28 – Comparação das médias de idade entre pacientes sem e com micrometástase linfática pelo teste t de Student

Idade	Número de casos	Média	Desvio padrão	Erro padrão
Sem micrometástase linfática	28	44,46	16,16	3,05
Com micrometástase linfática	21	37,00	14,82	3,23

p = 0,10

O $p = 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de micrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.4.2 GÊNERO

Oito homens em um total de 19 tiveram algum subtipo de micrometástase, enquanto 13 mulheres de um total de 30 também apresentaram tal fenômeno. Desta forma, não houve diferença entre a distribuição por gênero dos pacientes entre os grupos sem e com micrometástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p = 1$)(Tabela 29).

Tabela 29 – Comparação entre as frequências de pacientes sem e com micrometástase linfática por gênero pelo teste exato de Fisher

Gênero	Sem micrometa	Com micrometa	Total
Masculino	11	8	19
Feminino	17	13	30
Total	28	21	49

$p = 1,0$

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.4.3 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA

Observou-se que 16 dos 38 tumores centrais e 5 dos 11 tumores periféricos enviaram algum subtipo de micrometástase para os linfonodos ressecados. Desta forma não foi detectada diferença entre a distribuição por posição central, na via aérea, ou periférica, no parênquima pulmonar, dos tumores entre os grupos dos pacientes sem e com micrometástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p = 1$)(Tabela 30).

Tabela 30 – Comparação entre as frequências de pacientes sem e com micrometástase pela localização central ou periférica do tumor pelo teste exato de Fisher

Localização	Sem micrometa	Com micrometa	Total
Central	22	16	38
Periférica	6	5	11
Total	28	21	49

p = 1,0

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.4.4 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO DO TUMOR

Não foi detectada diferença entre o diâmetro do maior eixo do tumor entre os grupos de pacientes sem e com micrometástase (Teste de Mann-Whitney bicaudado, $p=0,59$)(Tabela 31).

Tabela 31 – Comparação das medianas do diâmetro do maior eixo do tumor de pacientes sem e com micrometástase pelo teste de Mann-Whitney

Qualquer metástase linfática	N	Mediana	Soma dos Ranques
Sem	28	25,93	726,0
Com	21	23,76	499,0
Total	49		

p = 0,59

O $p > 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de qualquer tipo de metástase no modelo de regressão logística.

5.4.4.5 MARGEM CIRÚRGICA COMPROMETIDA

Não houve diferença entre a distribuição, por presença de células malignas na margem de ressecção cirúrgica, dos pacientes entre os grupos sem e com micrometástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=0,38$)(Tabela 32).

Tabela 32 – Comparação da frequência de margem cirúrgica comprometida pelo tumor em pacientes sem e com micrometástase pelo teste exato de Fisher

Margem cirúrgica comprometida	Sem micrometa	Com micrometa	Total
Sem	26	17	43
Com	2	4	6
Total	28	21	49

p = 0,38

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.4.6 METÁSTASE HEMATOGENICA

Não houve diferença entre a distribuição por presença de metástase hematogênica no acompanhamento pré e pós-operatório dos pacientes entre os grupos sem e com micrometástase (teste exato de Fisher bicaudado, $p=1$)(Tabela 33).

Tabela 33 – Comparação da frequência de metástase hematogênica em pacientes sem e com micrometástase pelo teste exato de Fisher

Metástase Hematogênia	Sem micrometa	Com micrometa	Total
Sem meta	27	21	48
Com meta	1	0	1
Total	28	21	49

p = 1,0

O $p>0,1$ faz com que este resultado da análise univariada não eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

5.4.4.7 RESUMO DAS ANÁLISES DOS GRUPOS SEM E COM MICROMETÁSTASE LINFÁTICA

Tabela 34 – Resumo das análises dos grupos sem e com micrometástase linfática

	p
Idade	0,10
Gênero	1,0
Localização central ou periférica	1,0
Diâmetro do maior eixo do tumor	0,59
Margem cirúrgica acometida	0,38
Metástase hematogênia	1,0

Não houve à análise univariada nenhuma variável candidata a ser preditiva do fenômeno binário “presença/ ausência de micrometástase linfática”, por isso o modelo de regressão logística não foi testado.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O capítulo de discussão será didaticamente dividido em partes para melhor compreensão do leitor.

A primeira parte deste capítulo será dedicada à análise das limitações do método, dado que somente sob a ótica destas limitações pode se julgar a real validade dos resultados obtidos. A segunda parte discutirá os resultados referentes aos objetivos principais propriamente ditos.

6.1 LIMITAÇÕES DO MÉTODO

6.1.1 LIMITAÇÕES DO DESENHO DO ESTUDO

Por se tratar de um estudo retrospectivo, sendo em sua base um estudo de coorte transversal, não houve uniformidade quanto à dissecação linfática do mediastino e do hilo pulmonar. Mesmo hoje em dia não há evidência conclusiva na literatura que indique a necessidade de se realizar uma dissecação linfática radical dos linfonodos hiliares e do mediastino. Na maioria das séries descritas opta-se por procedimentos menos invasivos, como segmentectomias e ressecções em manga, quando possíveis, assim como não se descreve a linfadenectomia radical como rotina^{18, 28, 31, 41}. Isto se deve ao entendimento de que os tumores carcinóides típicos broncopulmonares apresentam poucas metástases linfáticas e hematogênicas, com pequeno risco de recidiva a médio e longo prazo. Apenas um trabalho relata o oposto, sendo que o trabalho demonstra que a presença de micrometástase em linfonodos mediastinais neste

tipo de tumor aumenta a mortalidade destes pacientes ⁵². Isso levantaria a discussão de que seria ético ou não propor um procedimento do qual não se conhece nem o valor terapêutico e nem mesmo o papel no estadiamento deste tumor por ressecção linfonodal mediastinal. Por este motivo, foi optado por iniciar o nosso trabalho realizando estudo com o levantamento retrospectivo dos casos já operados por tumor carcinóide típico broncopulmonar, tendo sido excluídos aqueles casos que não possuíam pelo menos dois linfonodos dissecados durante o procedimento cirúrgico.

6.1.2 LIMITAÇÕES DO TAMANHO DA AMOSTRA

Em relação às limitações do estudo decorrente do tamanho da amostra, deve-se ressaltar que para que se possa aplicar um modelo preditivo, deve-se dispor de uma amostra suficiente que inclua tanto um grande número de ocorrências do fenômeno a ser predito, quanto de pacientes com a ausência do fenômeno, que neste estudo é a presença de metástase linfática nos seus diversos subtipos de apresentação (metástases, células tumorais isoladas e grupo de células tumorais). O objetivo inicial deste trabalho era evidenciar de forma clara e consistente a presença destes eventos. Os resultados não deixam margem a qualquer dúvida de que todos estes eventos realmente existem, confirmando a hipótese de número 1. A partir do momento que encontramos 53% de pacientes com algum tipo de metástase, optamos por reduzir os custos do trabalho e não prosseguimos com a inclusão de novos pacientes, pois os quesitos básicos citados acima (ocorrência e ausência do fenômeno) haviam sido preenchidos.

6.1.3 LIMITAÇÕES POR VIÉS DE SELEÇÃO

Um dos critérios de inclusão foi a presença de pelo menos dois linfonodos mediastinais enviados à parte da peça operatória principal. Outro critério foi o acompanhamento completo por 5 anos. Isso fez com que 31 pacientes não fossem incluídos neste estudo.

Pode-se questionar que a frequência de metástase linfática nesta série é seguramente hiperavaliada por se tratar de uma população composta por um grupo de doentes que tiveram todo o seu mediastino dissecado e parte do grupo em que apenas houve amostragem dos linfonodos do mediastino. Neste último grupo a exploração cirúrgica do mediastino só foi realizada nos casos em que o cirurgião julgou necessário tal procedimento, pois em nosso serviço essa dissecação não é realizada de rotina. Um dos critérios utilizados pelo cirurgião para proceder ou não à dissecação do mediastino é a suspeita de haver linfonodos acometidos por metástase, ou por estarem com diâmetro aumentado ou com a consistência endurecida.

Obviamente nos casos onde houve suspeita, o risco de realmente haver um tipo qualquer de metástase é maior do que no grupo onde tal suspeita não foi levantada. Mesmo a mera presença de micrometástase pode hipoteticamente gerar uma reação no linfonodo no qual fenômenos podem alterar o volume ou a consistência das estruturas.

Por outro lado, quando pegamos a população na qual o mediastino foi totalmente esvaziado notamos que há a presença de qualquer tipo de metástase em 64,2% dos casos, isto é, um resultado maior do que o do grupo.

Isto pode nos levar a pensar o oposto, isto, é, que quanto maior a amostragem linfonodal, maior a possibilidade de se encontrar qualquer tipo de metástase.

6.1.4 LIMITAÇÕES DA DEFINIÇÃO DA ENTIDADE NOSOLÓGICA

A definição precisa das várias entidades nosológicas no espectro de proliferações neuroendócrinas broncopulmonares ainda não está clara. As hiperplasias neuroendócrinas, os “Tumorlets” e os tumores propriamente ditos, ao serem avaliados por patologistas, evidenciam um fenômeno que coloca em dúvida a validade dos atuais critérios diagnósticos para se diferenciá-los entre si. A diferença principal entre a vertente benigna e a maligna seria a ausência de invasão da lamina basal, porém os conglomerados de células tumorais (vertente maligna) algumas vezes impossibilitam a visualização de tal estrutura. Dessa forma, não se pode dizer que houve invasão da lâmina basal em todos os tumores carcinóides típicos classificados como tal. Daí a incerteza. Esta é uma dificuldade encontrada por patologistas experientes e até mesmo aqueles que estudam a fundo tal classificação^{9, 10, 16}.

6.1.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO BIOMOLECULAR

Ainda dentro da análise de limitações do método devemos ressaltar o estudo biomolecular das micrometástases baseado na presença de imunomarcação. Sabe-se que a imunomarcação de uma lâmina histológica é o resultado de uma série de processos laboratoriais já descritos anteriormente no método. Sabe-se também que uma heterogeneidade ou mesmo falha em

qualquer desses processos pode gerar alteração no padrão de imunomarcção e conseqüentemente falseamento dos resultados. Por este motivo tentamos ao máximo reduzir as possíveis falhas técnicas durante a confecção das lâminas, tendo como ponto positivo a possibilidade de processá-las em uma mesma bateria por utilizar um menor número de pacientes. Porém, apesar de haver tanto controle externo positivo realizado com a coloração imuno-histoquímica de ilhotas de pâncreas que possuem células neuroendócrinas, quanto controle externo negativo obtido com o restante do parênquima pancreático, que não as possuem, o mesmo não ocorre com os controles internos. Para esses marcadores neuroendócrinos analisados em linfonodos, somente há o controle interno negativo que é exatamente o parênquima do linfonodo que não foi corado. É importante ressaltar que não há controle interno positivo para marcadores neuroendócrinos nos linfonodos, pois naturalmente o linfonodo não possui células que expressem tais moléculas. Isso pode teoricamente suscitar a seguinte dúvida: será que os tecidos linfáticos não corados realmente não tinham qualquer célula neuroendócrina, ou foi apenas uma falha no método de coloração? Mais uma vez recorreremos à confecção das lâminas, realizada em laboratório com alto controle de qualidade (Laboratório de Imuno-histoquímica do serviço de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e tendo as lâminas sido processadas na mesma bateria, para inferirmos que o controle interno positivo está correto, isto é, as lâminas que foram coradas pela imuno-histoquímica são realmente positivas para células tumorais neuroendócrinas.

6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS, CIRÚRGICOS E BIOMARCADORES DA CASUÍSTICA GERAL

6.2.1 GÊNERO

Em nossa casuística houve uma predominância do sexo feminino em 3/2 casos, sendo que a frequência do mesmo foi de 61,2%. O sexo masculino é menos acometido pelo tumor carcinóide típico do que o feminino quando analisamos a literatura ^{14, 16}, sendo que a diferença entre ambos não é pronunciada. Porém, em estudos que analisam simultaneamente os carcinóides típicos e atípicos, existem divergências quanto à predominância do gênero feminino ^{27, 28, 32}. A nossa impressão subjetiva baseada na vivência clínica é de que exista mais do que uma entidade sob aquilo que hoje ainda classificamos como tumor carcinóide típico. Essa classificação é baseada numa mera análise feita apenas pela coloração tradicional de hematoxilina-eosina. Por isso é possível que haja uma doença mais benigna que acomete as mulheres brancas jovens, que predomina nas vias aéreas mais centrais, que não gera metástase nem óbito. Nós acreditamos em nosso grupo multicêntrico (franco-luso-greco-brasileiro) que talvez entre esses tumores de mulheres brancas jovens haja mesmo caso de mera hiperplasia de células neuroendócrinas. Isso explicaria o predomínio do sexo feminino quando considerados apenas os casos de tumor carcinóide típico broncopulmonar.

Em relação às micrometástases, não há trabalhos na literatura que afirmem qual gênero possui maior incidência das mesmas. Em nosso grupo

houve 8 pacientes do sexo masculino num total de 19 (42,1%) que apresentaram micrometástase, enquanto no sexo feminino houve 13 pacientes num total de 30 (43,3%). Portanto neste grupo não houve diferença em relação à frequência de micrometástase por gênero. Acreditamos que as células isoladas e os grupos de células tumorais, isto é, ambos os tipos de micrometástases presentes nos linfonodos, não representem exatamente o mesmo fenômeno que a presença de macrometástases completamente desenvolvidas. O trabalho clássico de Mandriotta ⁸³ demonstrou que mesmo células bem diferenciadas podem ter a capacidade de trafegar pela circulação linfática e se estabelecer em linfonodos. Também acreditamos que nem todas estas células se desenvolverão em macrometástases. Por isso micrometástases ocorreriam em frequência parecida entre os gêneros, mas as verdadeiras e desenvolvidas macrometástases tenderiam a ocorrer com maior frequência em tumores mais agressivos, que em nossa experiência multicêntrica predomina em homens.

Apenas para comparação didática, em relação às macrometástases, em trabalho anterior que incluiu toda a coorte de pacientes operados, publicado pelo o grupo de estudo de Neoplasias Neuroendócrinas do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a real incidência deste evento em pacientes do sexo masculino foi de 39% e no sexo feminino foi de 12,5% ¹⁶. Em nosso grupo encontramos 5 pacientes do sexo masculino (26,3%) e 4 do sexo feminino (13,3%) com macrometástase. Portanto a frequência de micrometástases por gênero é maior do que a de macrometástase quando comparados estes eventos em nosso grupo ^{54, 73, 74}.

6.2.2 IDADE

A média de idade em nosso estudo foi de 41,3 anos, variando de 17 a 77 anos. O grupo de pacientes sem micrometástase apresentou média de idade maior (44,4 anos) do que os pacientes com micrometástase (37 anos). A avaliação pelo teste t de Student apresentou um $p = 0,10$. Portanto esta variável não é candidata a ser preditiva do evento micrometástase pela análise univariada, apesar de que ela deva ser utilizada na análise multivariada por regressão logística, caso haja outras variáveis com p até 0,10, pois este p foi o escolhido para que uma variável seja eleita à análise univariada para ser incluída e verificada no modelo preditivo.

Apesar da nossa impressão clínica de que pacientes em faixa etária mais elevada tenham maior risco de sofrerem o fenômeno de macrometástase, não temos como ter qualquer impressão clínica em relação às micrometástases, dado que são assintomáticas e não aparecem ao exame de imagem que é realizado na rotina pós-operatória, a tomografia computadorizada de tórax, e que também não aparece rotineiramente no exame de octreoscan. A literatura não possui avaliação prévia a este trabalho em relação ao risco de micrometástase em relação à idade. Sabe-se, porém, que em relação às macrometástases, a idade mais avançada é fator preditor deste evento ^{16, 32, 71,}

6.2.3 LOBO ACOMETIDO PELO TUMOR

Em relação ao local acometido pelo tumor, houve uma distribuição homogênea nos diversos lobos e brônquios principais, sendo que o brônquio principal esquerdo foi o local mais acometido (18%). Supúnhamos que pudesse haver alguma diferença de localização entre as populações de células neuroendócrinas brônquicas que gerassem o tumor carcinóide típico, que fossem mais centrais, nos brônquios principais por exemplo, dado que os tumores do subtipo atípico são geralmente mais periféricos. Em outras séries estudadas também não foi encontrado um local mais prevalente para a ocorrência dos carcinóides típicos, sempre ocorrendo uma distribuição uniforme pelo pulmão ^{28, 52, 75}.

Um dado interessante é que dos 15 pacientes que apresentaram tumores nos brônquios centrais (brônquio principal esquerdo, direito ou intermédio), isto é, 30,6% dos casos, 66,6% apresentou algum tipo de metástase, e 53,3% apresentou algum tipo de micrometástase.

6.2.4 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA DO TUMOR

Em nossa casuística encontramos 38 pacientes (78%) com tumores em localização central, enquanto 11 (22%) estavam em posição periférica. Na maioria das séries estudadas os relatos são de que os tumores carcinóides típicos broncopulmonares apresentam posição predominantemente central ^{14, 16, 28, 77}. Isto decorre do fato de que as células originárias deste tumor, as células de Kulchitsky, que estão presentes em todo o epitélio broncopulmonar,

são mais freqüentes na região central, isto é, nos brônquios principais e lobares, e mais raras nas regiões periféricas do pulmão ^{5, 6}. Devido a esta população de células precursoras dos tumores carcinóides típicos broncopulmonares ser mais acentuada em posições centrais, a possibilidade de desenvolvimento de tumores é maior.

6.2.5 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO DO TUMOR

Alguns autores sugerem que os tumores de maior dimensão têm maior chance de gerar metástase ^{19, 32, 76}. O diâmetro do maior eixo do tumor em nossa casuística variou de 5 a 80 mm, com mediana de 25 e intervalo interquartil de 25 a 75% de 16 a 35 mm.

Em nossa casuística não houve correlação entre a presença de micro ou macrometástases com o diâmetro do tumor. Isto vai de encontro ao que alguns autores verificaram em seus trabalhos ^{38, 71, 72}. Obviamente toda macrometástase já foi uma célula ou grupo de células isolado, mas nós acreditamos baseados em nossos resultados, que nem toda micrometástase evoluirá para macrometástase. O que depreendemos desta análise é que provavelmente as células tumorais que vão dar origem às macrometástases tenham a capacidade biomolecular de se desprender do tumor mãe sem sofrer o processo de morte por anoikis, de progredir pelo interstício, de ultrapassar a parede vascular do endotélio sanguíneo ou linfático, sobreviver ao ambiente intravascular, implantar-se no tecido alvo, lá se proliferar, fixar e ainda apresentar escape imune.

6.2.6 RESSECÇÃO PULMONAR REALIZADA

A maioria das ressecções pulmonares realizadas em nossa casuística foi de lobectomias (54%). Quando somamos às lobectomias, as bilobectomias e pneumonectomias, perfazemos 84% dos casos. Isto se deve principalmente à localização do tumor, que nesta série foi de 78% de casos centrais. Em outras séries da literatura também observamos que além dos tumores serem mais centrais, como discutido no item anterior, a maioria das ressecções realizadas foram lobectomias e pneumonectomias ^{72, 75, 77}.

As ressecções econômicas (broncoplastias, nodulectomias e segmentectomias) são realizadas em pacientes sem reserva pulmonar para se fazer cirurgias completas ou em casos de tumores localizados em brônquios principais onde não há comprometimento extenso da parede brônquica, geralmente em tumores pediculados, casos em que se faz broncoplastia seja como tratamento definitivo, bastante discutível do ponto de vista oncológico, seja como tratamento paliativo da obstrução como “ponte” para a operação definitiva em melhores condições anatômicas do parênquima distal. Outra situação possível é a de achado radiológico de nódulo periférico que foi operado e através do exame de congelação durante a cirurgia faz-se o diagnóstico presuntivo de carcinóide broncopulmonar típico. Devido à baixa incidência de metástase desta entidade, opta-se pela ressecção econômica ^{16, 75, 77}.

Mesmo ainda com sua pequena capacidade de metástase, apenas 10 a 15% dos casos, acreditamos que se deva realizar uma cirurgia oncológicamente completa, isto é, lobectomia pulmonar com dissecação linfática

mediastinal, devido à possibilidade de recidiva tardia do tumor por doença residual que apesar de não ser letal, é mórbido, pois nesses casos há sempre a dúvida de se realizar ou não a reintervenção cirúrgica para ressecção da massa recidivante^{16, 52, 75, 77}. De toda forma, até que se prove o contrário, a linfadenectomia radical nestes casos é realizada apenas com o intuito de um melhor estadiamento.

6.2.7 MARGEM CIRÚRGICA ACOMETIDA PELO TUMOR

Em relação à margem cirúrgica comprometida, houve um total de seis casos em 49 operados (12%). Destes seis casos, dois apresentaram todos os tipos de metástase linfática, isto é, macrometástase, grupos de células tumorais e células tumorais isoladas. Um caso apresentou macrometástase linfática isolada, outro caso apresentou somente grupos de células e outro apresentou apenas células tumorais isoladas. Finalmente o último caso não apresentou nenhum tipo de metástase. Avaliando-se pelo tipo de metástase linfática, temos o seguinte resultado: três casos apresentaram macrometástase, três casos apresentaram grupos de células e três casos apresentarem células tumorais isoladas. Não são necessariamente casos diferentes, pois um caso pode apresentar uma ou mais formas de metástase linfática simultaneamente.

Não se deve considerar acometimento linfonodal pelo tumor como fenômeno associado ao comprometimento neoplásico da margem cirúrgica. Isso, pelo fato de todos os linfonodos positivos para células malignas terem sido ressecados no mesmo ato operatório que a ressecção do tumor. Avalia-se

a margem cirúrgica comprometida pelo fato de se entender que o tumor mais agressivo pode invadir mais rapidamente os tecidos adjacentes, inclusive o brônquio sujeito à linha de sutura. Portanto aqueles tumores mais agressivos teriam teoricamente maior probabilidade de apresentar metástase de qualquer natureza.

No seguimento pós-operatório de no mínimo cinco anos, não se observou qualquer indício clínico ou radiográfico de linfonodomegalia mediastinal ou hilar nesta amostra. É muito pouco provável que o fato de haver células no limite da ressecção cirúrgica tenha gerado acometimento dos linfonodos durante a operação. O fato mais intrigante é o de não ter havido registro de sinais endoscópicos ou sintomas de recidiva tumoral no coto brônquico ou na linha de anastomose, nem em prontuário, nem durante a entrevista nem durante o exame clínico realizados no ambulatório especializado. Os seis casos foram acompanhados, sendo que infelizmente um paciente foi a óbito 18 meses após o ato operatório por causas não relacionadas ao tumor. Sugerimos fortemente a análise de congelação nesses casos^{28, 72, 78, 79}.

6.2.8 QUANTIDADE DE LINFONODOS RESSECADOS POR PACIENTE

A quantidade de linfonodos variou de dois a 24 linfonodos por paciente, sendo que a ausência de linfonodos ressecados foi critério de exclusão deste trabalho. Esta variável já foi discutida anteriormente no item 6.1.3, (Limitações por viés de seleção). Apesar de ter havido exploração linfática mediastinal e hilar em alguns casos, em nosso meio não existe a rotina de se fazer o esvaziamento linfático radical em pacientes com tumor carcinóide típico

brônquios. Realizamos na grande maioria das vezes apenas amostragem. Esta, por sua vez, pode levar ao viés de seleção dos linfonodos positivos, uma vez que escolhemos aqueles que são macroscopicamente acometidos. Por outro lado, devemos lembrar que estes pacientes são freqüentemente vítimas de pneumonias por fenômenos obstrutivos devido aos tumores centrais. Isto acarretaria uma possibilidade de aumento dos linfonodos mediastinais devido apenas ao processo inflamatório advindo da infecção pulmonar, e não do comprometimento metastático dos mesmos.

Para verificarmos se havia diferença para mais de freqüência de micrometástase entre os pacientes com linfonodos retirados de forma radical, comparamos a freqüência de micrometástase destes pacientes, que foi de 63%, e a freqüência de micrometástase de todo o grupo, que foi de 52%. Portanto vemos um aumento de 11% na freqüência, provavelmente devido à maior “amostragem” daqueles pacientes submetidos a ressecção total, isto é, talvez quanto mais se procure micrometástase, mais se encontre.

6.2.9 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES SINAPTOFISINA E CROMOGRANINA A

A Sinaptofisina e a Cromogranina A são dois dos três marcadores principais de tumores neuroendócrinos. Juntamente com a Enolase Neurônio-específica, elas coram especificamente proteínas citosólicas, vesículas e grânulos secretórios destas células e são específicos para se marcar tecido neuroendócrino ^{4, 9}. Em nosso trabalho escolhemos as duas primeiras devido à experiência em se trabalhar com este material no laboratório utilizado para

realização da coloração imuno-histoquímica, evitando assim qualquer viés na confecção das lâminas. Além disso, nosso grupo prima pela pesquisa translacional, dado que somos um serviço assistencial também e não de pesquisa básica; dessa forma, utilizamos marcadores que são rotineiramente utilizados na prática de clínica cirúrgica.

Um dado curioso deste trabalho foi o de que em 19 dos 49 casos (38,7%), foram encontradas células ou grupos de células imunomarcadas por Sinaptofisina, enquanto em sete dos 49 casos (14,3%), foram encontradas células ou grupos de células imunomarcadas por Cromogranina A. Não existe qualquer trabalho na literatura que demonstre melhor marcação para tecido neuroendócrino por Sinaptofisina em relação à Cromogranina A. Encontramos em nossa casuística uma predominância pela marcação por Sinaptofisina em detrimento à Cromogranina A. Em 14 casos houve imunomarcação exclusiva por Sinaptofisina, enquanto apenas dois casos tiveram imunomarcação exclusiva por Cromogranina. Em cinco casos houve marcação simultânea. Seria de se esperar que houvesse uma maior correlação entre os dois marcadores. Mas, se formos analisar a coloração imuno-histoquímica dos tumores durante seu estudo anatomopatológico habitual, veremos também que nem todos os tumores se coram com todos os imunomarcadores neuroendócrinos simultaneamente.

Em relação aos objetivos deste trabalho, podemos afirmar que a hipótese de número 1 é verdadeira, isto é, existem micrometástases linfáticas oriundas de tumores carcinóides típicos broncopulmonares que podem ser diagnosticadas através de coloração imuno-histoquímica pelos biomarcadores Sinaptofisina e Cromogranina A.

Uma aplicação clínico-cirúrgica deste resultado é a de que em casos de tumor carcinóide típico negativo para um marcador neuroendócrino, pode haver a possibilidade do tumor ser positivo para outro marcador, principalmente se a primeira análise ter sido feita pela Cromogranina A.

6.2.10 MACROMETÁSTASE LINFÁTICA

Foram diagnosticados nove pacientes com macrometástase dos 49 pacientes da casuística (18,4%). Apesar de não se poder atribuir valor epidemiológico a este dado, é curioso notar que este valor está próximo do que a literatura prediz, que é de 10 a 15%^{19, 26, 39}. Estas macrometástases linfáticas foram todas diagnosticadas através de análise tradicional, com hematoxilina-eosina pela avaliação anatomopatológica inicial, logo após a ressecção do tumor.

Durante o acompanhamento ambulatorial de pelo menos cinco anos, não foram notadas recidivas tumorais linfáticas nesta coorte de pacientes, pois todos os pacientes desta casuística foram seguidos por este período de tempo, inclusive com realização de tomografia computadorizada de tórax. Portanto, em relação aos objetivos, podemos constatar que naqueles pacientes que possuíam qualquer tipo de micrometástase, nenhum evoluiu para macrometástase, inclusive sete pacientes acompanhados por mais de 10 anos. Então podemos afirmar que a hipótese 4 dos objetivos é falsa, pois não podemos fazer correlação entre a incidência de metástase e micrometástase linfática, isto é, as micrometástases não evoluíram para macrometástase tardiamente nesta casuística.

A literatura é controversa em relação a este tema. No que tange aos tumores broncogênicos do pulmão, para comparação, a tendência é que se afirme que a presença de micrometástase é fator de pior prognóstico para os pacientes. Isto seria a explicação do porquê os pacientes portadores deste tipo de neoplasia em fases iniciais (Estadiamento I e II), apresentarem recidiva linfática após cirurgia radical com intenção curativa. Algumas das micrometástases deixadas nos linfonodos não ressecados se desenvolveriam em macrometástases, com o conseqüente retorno, ou melhor, desenvolvimento natural do tumor. Devido a este fato, a taxa de cura do câncer de pulmão não seria de 100%, estando em torno de 50 a 75% nestes estágios ^{65, 80, 81}. Por outro lado existem aqueles autores que afirmam que as micrometástases não evoluem para macrometástases, que aquelas seriam destruídas pelo sistema imune através de células NK as quais possuem atividade antitumoral após a retirada do tumor primário ⁷⁴. Porém, em tese de doutorado deste mesmo programa, a Dra Andréa Anneliese Reichmut Day já demonstrou que as células do tumor carcinóide típico tem a capacidade de escapar do sistema imune através de imunomodulação, tese em andamento, ainda não publicada.

Em relação aos tumores carcinóides típicos broncopulmonares, existe apenas um trabalho na literatura que afirma que a presença de micrometástase neste tipo de tumor aumenta a taxa de recidiva e piora o prognóstico dos pacientes por diminuir o tempo de sobrevivência ⁵². Porém o que notamos neste trabalho é que o autor utiliza em sua casuística pacientes com tumores carcinóides típicos e atípicos. Sabidamente os tumores carcinóides atípicos broncopulmonares possuem um comportamento maligno, comparável aos tumores broncogênicos ^{40, 43, 44}. Portanto podemos ter um viés de seleção

nesta amostra, pois compara duas entidades que possuem evoluções distintas, sendo o tumor carcinóide atípico mais agressivo.

6.2.11 ÓBITOS

Houve seis óbitos em nosso grupo de pacientes (12,2%), sendo dois relacionados à doença. Um foi devido à doença propriamente dita, uma vez que o paciente apresentou corrosão extensa do esôfago, traquéia, carina e brônquio principal esquerdo provocada pelo tumor. Apresentou insuficiência ventilatória por torção de endoprótese colocada para a correção desta corrosão, evoluindo a óbito seis meses após a primeira cirurgia. O segundo caso foi decorrente de complicações pós-operatórias (sepse), dois dias após o ato cirúrgico. Portanto verificamos que nenhum óbito está relacionado à presença de micrometástase ou recidiva tardia da mesma.

6.3 ANÁLISE UNIVARIADA

Na análise univariada optamos por realizar quatro avaliações distintas. Inicialmente realizamos uma análise univariada para comparação entre os grupos de pacientes sem e com apenas macrometástase, sem levar em consideração as micrometástases. Esta análise serve para comparação de nossa casuística com a literatura, sendo que o comportamento das macrometástases já é bem estabelecido^{13, 16, 18}. A segunda análise se refere à comparação entre pacientes sem e com macrometástase/ grupos de células tumorais. Tentamos, dessa forma, verificar se o limite arbitrário entre

macrometástase e micrometástases “grandes” poderia ser fonte de um eventual erro de interpretação dos resultados. Esta forma de micrometástase, grupo de células tumorais, é a que mais se aproxima das macrometástases, do ponto de vista do tamanho e possivelmente do comportamento^{53, 74}. Portanto, para observarmos se existe um significado biológico, que poderia eventualmente se traduzir na melhora na predição do risco de macrometástases, optamos por acrescentar as micrometástases maiores na análise. A terceira análise foi realizada através da comparação entre pacientes sem e com qualquer tipo de metástase linfática, para verificar se o fenômeno de micro metástase seria mais próximo biologicamente do fenômeno de macro metástase, o que não parece ser na prática clínica, ou se eventualmente poderia representar em parte outro fenômeno, dado que não acreditamos que todas as micrometástases evoluam para verdadeiras macrometástase, com já dissemos anteriormente. Esta análise nos mostra se as macrometástases e as micrometástases possuem um comportamento simultaneamente diferenciado quando as comparamos com pacientes sem qualquer tipo de metástase. Por último realizamos a análise que gerou a segunda e terceira hipóteses deste trabalho, que é a comparação entre os pacientes sem e com micrometástases.

6.3.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM MACROMETÁSTASE

Como relatado acima, a intenção desta primeira avaliação é realizar comparação da nossa casuística com o que a literatura nos mostra acerca da presença de macrometástases em pacientes com tumor carcinóide típico broncopulmonar.

6.3.1.1 IDADE

A hipótese verificada foi de que pacientes mais idosos teriam mais macrometástase do que os mais jovens. A média de idade daqueles pacientes que tiveram macrometástase nesta série foi de 39,3 anos com desvio padrão de 15,4 anos e erro padrão da média de 5,1 anos e a média de idade dos pacientes que não as tiveram foi de 41,7 anos com desvio padrão de 16,1 anos e erro padrão da média de 2,5 anos. Pelo teste t de Student não houve diferença entre as médias de idade dos grupos pois o p foi de 0,69. O nosso resultado não vai de encontro ao que a literatura prevê, pois a mesma nos mostra que a média de idade dos pacientes que apresentam macrometástase é maior do que os que não apresentam este evento ^{16, 32, 71, 72}.

6.3.1.2 GÊNERO

A hipótese verificada foi a de que o gênero masculino apresenta mais macrometástase do que o feminino. Em relação aos homens, houve frequência

de 26,3% de macrometástase, enquanto nas mulheres foi de 13,3%. Apesar da frequência de macrometástase nesse grupo de homens ter sido o dobro daquela observada no grupo de mulheres, não houve diferença estatística significativa entre a distribuição por gênero dos pacientes entre os grupos sem e com macrometástase, pois o teste exato de Fisher teve p de 0,28. Em estudos de coorte anteriores demonstrou-se que as macrometástases são mais freqüentes em homens ^{16, 32}. Levando-se em consideração que também os carcinóides atípicos são mais freqüentes em homens, pode-se pensar que o gênero masculino possui tumores com características mais agressivas.

6.3.1.3 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA DO TUMOR

A hipótese verificada é a de que os tumores periféricos tem maior potencial de gerar macrometástase do que os centrais ⁷¹. Não houve diferença entre a distribuição por localização do tumor em posição central às vias aéreas superiores ou periféricos no parênquima pulmonar entre os grupos sem e com macrometástase em nossa casuística, pois o teste exato de Fisher teve p de 0,66. Isto se apresenta de acordo com alguns trabalhos da literatura ^{14, 19, 82}.

Acreditamos que a exclusão dos tumores mais benignos resultou na perda do “contraste” da posição mais central dos menos agressivos e mais periférica dos mais agressivos, conforme demonstramos em publicações anteriores ¹⁶. Um fator de confusão que poderia explicar a pior evolução dos tumores carcinóides típicos periféricos, é o fato de terem tendência a permanecerem assintomáticos até atingirem dimensões que os tornariam sintomáticos em posição central. Lesões mais centrais tenderiam a causar sintomas obstrutivos mais

precocemente, além de tosse e hemoptise, portanto seriam diagnosticados também mais precocemente, evitando maior chance de qualquer metástase.

6.3.1.4 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO DO TUMOR

A hipótese verificada foi a de que tumores com maior diâmetro teriam maior probabilidade de apresentar metástase como sugerido por alguns autores^{19, 32, 76}. Apesar do valor da mediana ter sido maior no grupo de tumores que não geraram macrometástase linfática, a dispersão dos valores fez com que não houvesse diferença estatística significativa entre os dois grupos de valores, o que vem de encontro ao achados de alguns autores^{38, 71, 72}.

O maior diâmetro dos tumores primários que não geraram macrometástase variou entre cinco e 80 milímetros; tiveram diâmetro mediano de 225,1 milímetros e intervalo entre os quartis 25 e 75% entre 16,3 e 35 milímetros. Considerando-se os tumores que geraram macrometástase, o maior diâmetro variou de cinco a 60 milímetros, com mediana de 24,2 milímetros e intervalo inter-quartis 25 a 75% entre 12,5 e 35 milímetros.

Em conclusão, não houve diferença entre o diâmetro do maior eixo do tumor entre os grupos de pacientes que tiveram e não tiveram macrometástase no grupo estudado, pois o teste de Mann-Whitney teve p de 0,86.

6.3.1.5 MARGEM CIRÚRGICA ACOMETIDA PELO TUMOR

A hipótese verificada foi a de que os tumores que não puderam ser ressecados completamente e que tiveram células remanescentes na margem

cirúrgica foram os teoricamente mais invasivos, os quais teriam maior capacidade de comprometer tecidos adjacentes, e portanto teriam maior capacidade de gerar macrometástase. Não houve diferença quanto à frequência de margem cirúrgica comprometida por células malignas quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase, pois o teste exato de Fisher teve p de 0,067. Porém, o $p < 0,1$ faz com que este resultado da análise univariada eleja esta variável como candidata a predizer o risco individual de macrometástase no modelo de regressão logística.

6.3.1.6 PRESENÇA DE MICROMETÁSTASE

A hipótese verificada foi a de que tumores que geram macrometástase nos linfonodos têm maior probabilidade também de enviarem células malignas para outros linfonodos que serão diagnosticadas na forma de algum subtipo de micrometástase. Em última análise a hipótese é de que as micrometástases sejam apenas macrometástases ainda com diâmetros exíguos. Cinco dos 28 (17,9%) casos sem qualquer micrometástase tiveram macrometástase; fenômeno equiparável foi observado no grupo de pacientes que tiveram algum dos tipos ou mesmo os dois subtipos de micrometástases: quatro dos 21 (19%) pacientes tiveram macrometástase. Não houve diferença quanto à frequência de micrometástase quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase, pois o teste exato de Fisher bicaudado teve p igual a 1,0.

Com isto confirmamos que a hipótese de número 4 é falsa, pois não há correlação entre incidência de micrometástase e macrometástase. São eventos aparentemente independentes. . Isso explica o grande número de diagnóstico

de micrometástase em pacientes que nunca vieram a ter qualquer sinal de acometimento por macrometástase neste grupo de pacientes.

Esse dado tem uma aplicação clínico-cirúrgica muito importante, pois a procura de micrometástases nesses tumores não parece ter justificativa prognóstica. E mesmo no caso de se achar uma micrometástase, não se deve arbitrariamente considerar o paciente com sendo de maior risco para desenvolver macrometástase, esta sim com significado prognóstico.

Nos grupos europeus que participam do grupo multicêntrico franco-luso-greco-brasileiro, pacientes considerados de alto risco de desenvolverem macrometástase recebem o exame de Octreoscan no acompanhamento ambulatorial pós-operatório. Estes dados sugerem que tal exame não deve ser preconizado na rotina de pacientes que tiveram diagnóstico de micrometástase.

6.3.1.7 METÁSTASE HEMATOGÊNICA

A hipótese verificada foi a de que tumores que têm capacidade de alcançar os linfonodos e de obter sucesso no estabelecimento de colônias de células malignas nessas estruturas, também teriam maior capacidade de gerar metástase por via hematogênica. Não houve diferença quanto à frequência de metástase hematogênica quando comparados os grupos de pacientes sem e com macrometástase pois o teste exato de Fisher teve p de 0,18. Esta amostra é muito exígua e não houve um número de eventos metástase hematogênica nesta amostra que nos permitisse qualquer conclusão a esse respeito.

6.3.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM MACROMETÁSTASE/ GRUPO DE CÉLULAS TUMORAIS

Esta análise foi realizada agrupando-se os pacientes com macrometástase e os pacientes com grupo de células tumorais. Entende-se, como já foi mencionado acima no item 6.3, que a forma de micrometástase denominada grupo de células tumorais, que possui diâmetro entre 0,2 e dois milímetros, é a que mais se aproxima das macrometástases do ponto de vista do tamanho e possivelmente do comportamento^{53, 74}. Portanto utilizamos esta análise para verificar se a somação dos grupos poderia aumentar o poder de predição do risco individual de macrometástase em nosso grupo e se haveria novas variáveis que poderiam prever este evento. Porém como visto na tabela 20, manteve-se apenas a margem cirúrgica acometida como variável preditora do risco de macrometástase/ grupo de células tumorais com um p de 0,036. As demais variáveis seguiram o mesmo padrão encontrado quando se levou em conta apenas as macrometástases. Portanto não foi possível realizar uma análise multivariada por regressão logística, pois apenas uma variável apresentou p menor do que 0,1. Para não estender demasiadamente o texto, não iremos analisar isoladamente as demais variáveis, quais sejam: idade, gênero, localização central ou periférica, diâmetro do maior eixo do tumor e metástase hematogênica. As justificativas e explicações são as mesmas dadas para o grupo de pacientes unicamente com macrometástases.

Como conclusão, já citado anteriormente, percebe-se através da análise deste grupo de pacientes que realmente este grupo com micrometástases do

tipo grupo de células tumorais, quando analisado simultaneamente com o grupo de macrometástases apresenta um comportamento semelhante ao grupo com macrometástases isoladas, quando comparados com o grupo de pacientes sem micrometástases.

6.3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM QUALQUER TIPO DE METÁSTASE LINFÁTICA (MACROMETÁSTASE, GRUPO DE CÉLULAS TUMORAIS E CÉLULAS TUMORAIS ISOLADAS)

Esta análise foi realizada através da aglutinação de todos os grupos que apresentaram algum tipo de metástase linfática (seja macrometástase, grupos de células tumorais ou células tumorais isoladas). Esta análise nos mostra se as macrometástases e as micrometástases possuem um comportamento simultaneamente diferenciado quando as comparamos com pacientes sem qualquer tipo de metástase.

Nesta análise apenas a idade foi tida como variável preditora do risco de qualquer tipo de metástase linfática. O teste t de Student mostrou um p de 0,017. Porém verificamos que a média de idade dos pacientes sem qualquer tipo de metástase linfática é de 46,9 anos e que a média de idade dos pacientes com qualquer tipo de metástase linfática é de 36,3 anos. Portanto poderia se entender que os pacientes mais jovens são mais favoráveis a apresentar metástase. Deduz-se que houve uma contaminação do fenômeno de verdadeiras macrometástase, com valor prognóstico, por uma população de dados referentes a um fenômeno provavelmente distinto: a verdadeiras

micrometastases, que provavelmente podem acontecer em pacientes mais jovens. Se levarmos em conta o fenômeno simples “metástase”, não é o que encontramos em vários trabalhos e também em nossa coorte, que demonstram que a idade daqueles pacientes que apresentam metástase é maior^{16, 32, 71, 72}.

O nosso resultado apresenta uma repetição quando se avalia as médias de idade do grupo com macrometástases e do grupo com qualquer tipo de metástase linfática, sendo que em ambas a média de idade do grupo que apresenta metástase é menor. Isto provavelmente se deve ao pequeno número de pacientes avaliados. Provavelmente se for avaliada uma amostra maior de pacientes, a tendência da média de idade daqueles que apresentam metástase tenderá a ser maior, quanto mais o grupo representar a população geral.

6.3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS SEM E COM MICROMETÁSTASE

A última análise se refere à hipótese 2 dos objetivos deste trabalho. Refere-se à avaliação entre o grupo sem e com micrometástase para se verificar as possíveis diferenças entre estes grupos e se as variáveis estudadas são capazes de prever micrometástase. A hipótese 2 é exatamente a análise univariada destes grupos.

6.3.4.1 IDADE

Novamente notamos uma diferença entre as médias de idade entre os grupos sem e com micrometástase, apesar de não ter significância estatística.

A média de idade do grupo de pacientes sem micrometástase foi de 44,6 anos com desvio padrão de 16,1 anos e erro padrão da média de 3,0 anos. Considerando-se o grupo de pacientes com micrometástase nos linfonodos ressecados, a média de idade foi de 37 anos com desvio padrão de 14,8 anos e erro padrão de 3,2 anos. Após a avaliação pelo teste t de Student, temos um p de 0,10.

O que nos chama a atenção é a permanência neste grupo, assim como os grupos avaliados anteriormente, da média de idade menor naquele grupo que apresenta micrometástase. Na literatura não possuímos dados para comparação, pois temos apenas um trabalho indexado que avalia pacientes com carcinóide típico e atípico broncopulmonar simultaneamente⁵², porém este trabalho não compara as médias de idade entre os grupos sem e com micrometástase. Novamente, levando-se em consideração para comparação os pacientes com macrometástase, esperaríamos que o grupo com micrometástase, assim como os grupos de macrometástase em vários trabalhos, apresentasse média de idade mais alta, pois os pacientes mais idosos com tumor carcinóide típico broncopulmonar são mais agressivos^{16, 32, 71, 72}. Por outro lado, o resultado de p igual a 0,1 elege esta variável como candidata a predizer o risco individual de micrometástase no modelo de regressão logística.

6.3.4.2 GÊNERO

Em relação ao gênero, não houve diferença entre os grupos sem e com micrometástase. Oito homens em um total de 19 tiveram algum subtipo de

micrometástase, enquanto 13 mulheres de um total de 30 também apresentaram tal fenômeno. O teste exato de Fisher apresentou p igual a 1,0.

Assim como a idade, não dispomos de trabalhos para comparação, sendo este o primeiro desta natureza. O que poderíamos esperar é que o gênero masculino, por apresentar maior tendência à tumores mais agressivos ¹⁶, teria maior chance de micrometástase. Portanto vemos pelos resultados que em se tratando de micrometástase, o gênero não se mostra como variável para comparação entre os dois grupos, sem e com micrometástase, assim também não atuando como variável preditora de micrometástase.

6.3.4.3 LOCALIZAÇÃO CENTRAL OU PERIFÉRICA

Em relação à distribuição central ou periférica do tumor, esperar-se-ia que aqueles tumores mais periféricos, por apresentarem uma característica de maior agressividade ⁷¹, também apresentassem maior frequência de micrometástase. Quando comparadas as frequências de distribuição entre os grupos sem e com micrometástase em relação à posição central ou periférica, não houve diferença entre os grupos. Observou-se que 16 dos 38 tumores centrais e 5 dos 11 tumores periféricos enviaram algum subtipo de micrometástase para os linfonodos ressecados. Isto nos mostra que a localização central ou periférica não apresentou influência em relação à micrometástase neste grupo de pacientes. Após a análise pelo teste exato de Fisher, verificou-se que o p era igual a 1,0.

6.3.4.4 DIÂMETRO DO MAIOR EIXO DO TUMOR

A hipótese testada foi a de que quanto maior o diâmetro do tumor, maior seria a sua capacidade de apresentar micrometástase, como sugerido por alguns autores para macrometástases^{19, 32, 76}. A mediana do grupo que não apresentou micrometástase foi de 25,9, enquanto a mediana do grupo que apresentou micrometástase foi de 23,7. Após a avaliação pelo teste de Mann-Whitney, verificou-se um p de 0,59. Portanto não houve diferença entre os dois grupos como esperado. Não existe nenhum trabalho indexado para realizarmos comparação em relação ao diâmetro e a presença de micrometástase, mas comparando-se com as macrometástases, a maioria dos trabalhos mostra que não existe relação entre o tamanho e a presença de macrometástase^{38, 71, 72}.

6.3.4.5 MARGEM CIRÚRGICA COMPROMETIDA

A hipótese verificada foi a de que a presença de células tumorais remanescentes na sutura cirúrgica seria secundária a tumores teoricamente mais invasivos, os quais teriam maior capacidade de comprometer tecidos adjacentes, e portanto teriam maior capacidade de gerar micrometástase. Não houve diferença na distribuição entre os grupos sem e com micrometástase em relação à margem cirúrgica comprometida. Houve 2 pacientes com margem cirúrgica acometida em 28 sem micrometástase e 4 em 21 pacientes com micrometástase. Após a análise pelo teste exato de Fisher encontrou-se p de 0,38. Portanto a variável margem cirúrgica acometida não conseguiu prever a presença de micrometástase.

Dois fatos devem ser levados em consideração em relação aos 6 casos de margem cirúrgica comprometida, nesta análise. O primeiro é que nenhum paciente com margem cirúrgica comprometida apresentou recidiva mediastinal durante o período de acompanhamento. Fato que seria comum de ocorrer, por exemplo, em pacientes com tumores broncogênicos. O segundo fato, que já foi comentado anteriormente, é que nenhum paciente com margem cirúrgica comprometida apresentou registro de sinais ou sintomas de recidiva tumoral no coto brônquico ou na linha de anastomose, nem em prontuário, nem durante a entrevista e o exame clínico realizados no ambulatório. Ainda existe muita controvérsia se estes pacientes devem ser reabordados cirurgicamente ou não. Porém, há uma tendência a não reoperar pacientes com tumor presente microscopicamente na margem ressecada sem evidências macroscópicas, radiológicas ou endoscópicas, de recidiva^{28, 72, 78, 79}.

6.3.4.6 METÁSTASE HEMATOGÊNICA

A hipótese verificada foi a de que tumores que têm capacidade de alcançar os linfonodos e de obter sucesso no estabelecimento de colônias de células malignas nessas estruturas, também teriam maior capacidade de gerar metástase por via hematogênica. Assim como já visto nas avaliações anteriores, não houve diferença entre a distribuição, por presença de metástase hematogênica, no acompanhamento pré e pós-operatório dos pacientes entre os grupos sem e com micrometástase. Após a avaliação pelo teste exato de Fisher obteve-se um p igual a 1,0.

6.3.4.7 CONCLUSÃO

Temos então como conclusão que pela análise univariada não obtivemos nenhuma variável neste grupo capaz de prever a ocorrência de micrometástases. Todas as variáveis apresentarem $p > 0,05$. Apenas a idade apresentou p igual a 0,1, sendo então variável candidata a entrar na análise de regressão logística, porém como existiu apenas esta variável, não foi possível a análise proposta. Portanto a hipótese de número 2 é falsa, pois nenhuma destas variáveis analisadas é preditora de micrometástase neste grupo de pacientes com tumores carcinóides típicos broncogênicos.

6.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

Nenhuma das avaliações realizadas apresentou duas ou mais variáveis capazes de serem colocadas na análise multivariada por regressão logística. Em cada uma das avaliações obtivemos apenas 1 variável. Portanto não pudemos desenvolver neste grupo estudado uma equação matemática que pudesse prever o risco individual de micrometástase em pacientes com tumor carcinóide típico broncopulmonar. Por este motivo não podemos confirmar a hipótese de número 3, que nos diz ser possível a predição deste risco pela regressão logística.

6.5 PERSPECTIVAS

Através deste trabalho demonstramos que não existe correlação entre micrometástase e macrometástase nos pacientes estudados do Grupo de Estudo das Neoplasias Neuroendócrinas do Serviço de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Porém o trabalho não para neste ponto. Profundas dúvidas ainda nos fazem refletir acerca de que possíveis mecanismos possibilitam a existência de células tumorais presentes em linfonodos e possivelmente em outros órgãos. Seriam fenômenos de escape imune? Seriam receptores ou talvez substâncias produzidas pelas células tumorais que alterariam o microambiente, permitindo assim a sua presença nos linfonodos, sem que sofressem qualquer ataque do sistema imune? Os mecanismos de emissão de macrometástases são os mesmos das micrometástases? Os tumores poderiam ter características distintas de atipia, uns permitindo a emissão de células mais agressivas do que outros, por isso estas se desenvolveriam em metástases e as procedentes de tumores menos agressivos não?

No momento estamos apenas em fase inicial de nossa jornada como grupo de pesquisa, apesar de termos alcançado já inúmeras vitórias, inclusive no exterior, com a aprovação da comunidade científica internacional, através da obtenção de vários prêmios internacionais, com o Dr. João Carlos das Neves Pereira. Estamos finalizando este trabalho, já refletindo na continuidade do mesmo, através da comparação de pacientes com macrometástase e micrometástase pela análise de biomarcadores como o Ki-67, p53, Bax, Bcl3, fibras elásticas e fibras colágenas tumorais que nos mostrariam o

comportamento biológico do tumor em ambas as situações. Temos ainda Dra Andrea Anneliese Reichmut Day, também em tese de doutoramento, avaliando o perfil inflamatório do tumor através de imuno-histoquímica, além de alunos de iniciação científica em vários outros estudos.

Portanto o trabalho é intenso no grupo, pautado sempre pela assistência ao paciente, como ator principal no teatro da Medicina, além da necessidade incessante de busca de novos conhecimentos e tecnologias para melhor atender a este paciente que nos procura, muitas vezes com parcas esperanças de encontrar a sua cura.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7.1 – Existem micrometástases linfáticas de tumores carcinóides típicos broncopulmonares que podem ser diagnosticadas através de imunohistoquímica pelos marcadores Sinaptofisina e Cromogranina A.

7.2 – Não foi possível prever o risco individual de acometimento por micrometástase em pacientes com tumor carcinóide típico broncopulmonar pela análise das variáveis propostas nesta amostra populacional.

7.3 – Não foi possível estabelecer um índice numérico que represente o risco da ocorrência de micrometástase para cada doente.

7.4 – Não foi possível estabelecer correlação entre incidência de metástase e micrometástase nesta amostra populacional.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A

Tabela A1 – Dados clínicos, cirúrgicos e anatomopatológicos dos pacientes incluídos no estudo

n	Gen	Idade (anos)	Local	Oper	Status	Cent/Perif	Margem	T	Maior Diam	N	Linf. Dissec.	Linf. Posit.	M	Estad
1	1	50	5	2	1	0	0	2	20	0	11	0	0	2
2	1	27	4	2	1	0	0	1	25	0	5	0	0	1
3	2	17	3	3	1	0	0	2	16	0	3	0	0	2
4	2	66	1	3	1	1	0	1	7	0	5	0	0	1
5	2	42	1	2	1	0	1	2	35	0	19	0	0	2
6	2	52	3	3	1	0	0	2	60	0	24	0	0	2
7	1	34	4	2	1	0	0	1	25	0	5	0	0	1
8	2	24	1	2	1	1	0	2	50	0	4	0	0	2
9	1	39	3	2	1	0	0	2	40	0	15	0	0	2
10	2	49	4	2	1	1	0	2	32	0	7	0	0	2
11	2	71	5	1	0	1	0	3	25	0	6	0	0	4
12	2	67	6	1	1	1	0	1	5	0	8	0	0	1
13	2	29	8	4	1	0	0	1	30	0	5	0	0	1
14	1	70	4	1	1	1	0	2	30	0	15	0	0	2
15	1	34	2	3	1	0	0	1	20	0	2	0	0	1
16	2	18	7	4	0	0	0	3	30	1	20	1	0	5
17	2	41	3	2	1	1	0	1	18	0	3	0	0	1
18	2	25	3	2	1	0	0	1	20	0	3	0	0	1
19	1	62	6	2	0	0	0	2	30	0	12	0	0	2
20	2	43	5	2	1	0	0	1	20	0	5	0	0	1
21	2	38	8	5	1	0	0	1	15	0	12	0	0	1
22	1	17	6	2	1	0	0	2	18	0	12	0	0	2
23	1	42	5	2	1	0	0	1	40	2	10	2	0	5
24	2	62	8	4	1	0	0	3	70	0	9	0	0	4
25	2	57	4	2	1	0	0	1	9	0	5	0	0	1
26	2	69	5	2	1	1	0	1	5	2	14	2	0	5
27	2	24	4	2	1	0	0	1	25	1	10	2	0	5
28	2	28	8	4	1	0	0	3	40	0	4	0	0	4
29	2	42	8	4	1	0	0	3	20	0	5	0	0	4
30	2	32	4	4	1	0	0	3	42	0	7	0	0	4
31	2	37	2	3	1	0	0	2	45	0	3	0	0	2
32	1	37	1	2	1	1	0	1	30	0	8	0	0	1
33	1	32	8	4	1	0	1	1	10	1	17	1	0	3
34	1	20	8	2	1	0	0	1	17	0	2	0	0	1
35	2	35	1	2	1	0	1	1	15	0	3	0	0	1
36	1	77	3	2	1	0	0	2	40	0	2	0	0	2
37	1	45	1	2	1	0	0	2	30	1	16	1	0	5
38	1	46	8	5	0	0	1	3	20	1	4	2	1	7
39	1	48	6	2	1	0	0	1	5	0	5	0	0	1
40	2	24	8	4	1	0	0	3	10	0	11	0	0	4
41	2	24	6	2	1	1	0	2	35	0	2	0	0	2
42	1	47	6	0	1	1	0	1	7	0	2	0	0	1
43	1	42	5	2	1	0	0	2	30	0	2	0	0	2
44	2	20	7	5	1	0	0	3	20	0	8	0	0	4
45	2	61	7	1	0	0	0	4	80	0	7	0	0	6
46	1	29	2	3	1	0	0	2	60	2	7	1	0	6
47	2	49	6	2	1	0	1	1	15	3	4	3	0	6
48	2	36	4	2	1	0	0	1	18	0	6	0	0	1
49	2	42	7	4	0	0	1	4	15	0	13	0	0	6

Legenda :

n : número do caso

Gen : gênero (1 = masculino, 2 = feminino)

Local : local da cirurgia, 1 = lobo superior direito, 2 = brônquio intermédio, 3 = lobo médio, 4 = lobo inferior direito, 5 = lobo superior esquerdo, 6 = lobo inferior esquerdo, 7 = brônquio fonte direito, 8 = brônquio fonte esquerdo

Oper : Operação, 0 = nodulectomia, 1 = segmentectomia, 2 = lobectomia, 3 = bilobectomia, 4 = pneumonectomia, 5 = broncoplastia

Status : 0 = óbito, 1 = vivo

Cent/ Per : 0 = central, 1 = periférico

Margem : 0 = livre, 1 = comprometida

Maior Diam : maior diâmetro em mm

N : 0 = ausência de linfonodos comprometidos, 1 = linfonodos hilares ou pulmonares comprometidos, 2 = linfonodos mediastinais ipsilaterais comprometidos, 3 = linfonodos mediastinais contralaterais ou supraclaviculares comprometidos

Linf. Dissec. = linfonodos dissecados

Linf. Posit. = linfonodos positivos

M : 0 = ausência de metástase hematogênica, 1 = presença de metástase hematogênica

Est : estadiamento, 1 – IA, 2 – IB, 3 – IIA, 4 – IIB, 5 – IIIA, 6 – IIIB, 7 – IV

8.2 ANEXO B

Tabela B1 – Dados dos biomarcadores dos pacientes incluídos no estudo

n	Sinapto	Cromo	Sinapto/ Cromo	Padrão	CTI	GCT	Macro
1	A	A	A	2	0	0	0
2	M	A	M	0	1	0	0
3	M	A	M	0	1	0	0
4	A	M	M	1	0	1	0
5	A	A	A	2	0	0	0
6	A	A	A	2	0	0	0
7	M	A	M	0	1	0	0
8	M	A	M	0	1	1	0
9	M	A	M	0	1	0	0
10	M	A	A	2	1	0	0
11	A	A	A	2	0	0	0
12	M	M	M	1	0	1	0
13	A	A	A	2	0	0	0
14	A	A	A	2	0	0	0
15	M	A	M	0	1	0	0
16	A	M	M	1	1	0	1
17	A	A	A	2	0	0	0
18	A	A	A	2	0	0	0
19	A	A	A	2	0	0	0
20	A	A	A	2	0	0	0
21	A	A	A	2	0	0	0
22	A	A	A	2	0	0	0
23	M	A	M	1	1	1	1
24	A	A	A	2	0	0	0
25	A	A	A	2	0	0	0
26	A	A	A	2	0	0	1
27	A	A	A	2	0	0	1
28	M	A	M	0	1	0	0
29	A	A	A	2	0	0	0
30	A	A	A	2	0	0	0
31	A	A	A	2	0	0	0
32	M	A	M	1	1	0	0
33	M	M	M	1	1	1	1
34	M	A	M	0	1	0	0
35	M	A	M	1	0	1	0
36	A	A	A	2	0	0	0
37	A	A	A	2	0	0	1
38	A	A	A	2	0	0	1
39	A	A	A	2	0	0	0
40	A	A	A	2	0	0	0
41	A	A	A	2	0	0	0
42	A	A	A	2	0	0	0
43	A	A	A	2	0	0	0
44	M	A	M	0	1	0	0
45	M	M	M	1	1	0	0
46	A	A	A	2	0	0	1
47	M	M	M	1	1	1	1
48	M	A	M	0	1	0	0
49	M	M	M	0	1	0	0

Legenda :

n : número do caso

Sinapto : Sinaptofisina, A = ausência de micrometástase, M = micrometástase

Cromo : Cromogranina A, A = ausência de micrometástase, M = micrometástase

Sinapto/ Cromo : associação de Sinaptofisina e Cromogranina A

Padrão : 0 = célula tumoral isolada, 1 = grupo de células tumorais, 2 = ausência de micrometástase

CTI : célula tumoral isolada, 0 = ausência, 1 = presença

GCT : grupo de células tumorais, 0 = ausência, 1 = presença

Macro : macrometástase, 0 = ausência, 1 = presença

8.3 ANEXO C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

.....
DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

.....

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Predição do risco individual de micrometástase do tumor carcinóide típico broncopulmonar em função de variáveis clínicas, anatomo-patológicas e biomarcadores teciduais.

Pesquisador : Dr. José Ribas Milanez de Campos

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente do serviço de Cirurgia Torácica do INCOR-HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL :

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Cirurgia Torácica do InCor/ FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;
3. desconfortos e riscos esperados;
4. benefícios que poderão ser obtidos;
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Não se aplica ao protocolo, devido às características da pesquisa.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. José Ribas Milanez de Campos

InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar,

Dr. Daniel Messias de Moraes Neto

Idem

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 19 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO (Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Lubarsch O. Ueber den primären Krebs des ileum, nebst Bemerkungen über das gleichzeitige Vorkommen von Krebs und Tuberkulose. *Virchows Arch* 1888;111:280-317.
- 2) Oberndorfer S. Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frank Z Pathol* 1907;1:425-429.
- 3) Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *Thorac Cardiovasc Surg* 1972;64:413-421.
- 4) Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract : hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab invest* 1983;49:519-537.
- 5) Paladugu RR, Benfield JR, Pak HY, Ross RK, Teplitz RL. Bronchopulmonary Kulchitsky cell carcinomas : a new classification scheme for typical and atypical carcinoids. *Cancer* 1985;55:1303-1311.
- 6) Hage E. Histochemistry and fine structure of bronchial carcinoid tumours. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat.* 1973;361(2):121-128.
- 7) Taylor W. Pulmonary argyrophil cells at high altitude. *J Pathol.* 1977;122(3):137-44.
- 8) Warren WH, Gould VE, Faber P, Kittle CF, Memoli VA. Neuroendocrine neoplasms of the bronchopulmonary tract : a classification of the spectrum of carcinoid to small cell carcinoma and intervening variants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;89:819-825.

- 9) Capella C, Heitz PU, Höfler H, Solcia E, Klöppel G. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pâncreas and gut. *Virchows Arch* 1995;425:547-560.
- 10) Travis WD, Sobin LH. Histologic typing of lung and pleural tumours : international histologic classification of tumours (N°1). New York, NY: Springer-Verlag, 1999.
- 11) Wang JC, Shi DR, Fu XL, Lu WP, Shi FJ, Lu CL. Analysis of clinicopathologic features and morphogenesis of carcinoid tumorlets in the lung with bronchiectasis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2003 32(4):350-353.
- 12) Cheek RC, Wilson H. Carcinoid tumours. *Curr Probl Surg* 1970;Nov:04-31.
- 13) Godwin II JD. Carcinoid tumours : an analysis of 2837 cases. *Cancer* 1975;36:560-569.
- 14) Okike N, Bernatz PE, Payne WS, Woolner LB, Leonard PF. Bronchoplastic procedures in the treatment of carcinoid tumors of the tracheobronchial tree. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978;76:281-291.
- 15) Mcdorney RP, Kirklin JW, Woolner LB. Metastasizing bronchial adenomas. *Surg Gynecol Obstet* 1953;96:482-492.
- 16) Das-Neves-Pereira JC, Bagan P, Milanez-de-Campos JR, Capelozzi VL, Danel C, Jatene FB, Bernaudin JF, Riquet M. Individual risk prediction of nodal and distant metastasis for patients with typical bronchial carcinoid tumors. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 34(3):473-478
- 17) Engelbreth-Holm J. Benign bronchial adenomas. *Acta Chir Scand* 1944;90:383-409.

- 18) Thomas CF, Tazelaar HD, Jett JR. Typical and atypical pulmonary carcinoids : outcome in patients presenting with regional lymph node involvement. *Chest* 2001;119:1143-1150.
- 19) McCaughan BC, Martini N, Bains MS. Bronchial carcinoids : a review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1985 89:8-17.
- 20) DeCaro LF, Paladugu R, Benfield JR, Lovisatti L, Pak H, Teplitz RL. Typical and atypical carcinoids within the pulmonary APUD tumor spectrum. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980 79:532-536.
- 21) Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol Annu* 1983;18:287-330.
- 22) World Health Organization. Histologic typing of lung tumours. *Tumori* 1981;67:253-272.
- 23) Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, et al. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma : an ultrastructural , immunohistochemical and flow cytometric study of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 1991;15:529-553.
- 24) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of lung and pleural tumours; 1999.
- 25) Hage R, Rivière AB, Seldenrijk CA, van den Bosc JMM. Update in pulmonary carcinoid tumors : a review article. *Ann Surg Oncol* 2003;10:697-704.
- 26) Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumors. *NEJM* 1999;340:858-868.
- 27) Marty-Ané CH, Costes V, Pujol JL, Alauzen M, Pierre Baldet, Mary H. Carcinoid tumors of the lung : do atypical features require aggressive management? *Ann Thor Surg* 1995;59:78-83.

- 28) Rea F, Binda R, Spreafico G, Calabro F et al. Bronchial carcinoids : a review of 60 patients. *Ann Thorac Surg* 1989;47:412-414.
- 29) Grote TH, Macon WR, Davis B, Greco FA, Johnson DH. Atypical carcinoid of the lung. A distinct clinicopathologic entity. *Chest* 1988;93:370-375.
- 30) Ganim RB, Norton JA. Recent advances in carcinoid pathogenesis, diagnosis and management. *Surg Oncol* 2000;9:173-179.
- 31) Ferguson MK, Landreneau RJ, Hazelrigg SR, Altorki NK et al. Long-term outcome after resection for bronchial carcinoid tumors. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18:156-161.
- 32) Harpole DH, Feldman JM, Buchanan S, Young WG, Wolfe WG. Bronchial carcinoid tumours : a retrospective analysis of 126 patients. *Ann Thorac Surg* 1992;54:50-55.
- 33) Vadasz P, Palffy G, Egervary M, Schaff Z. Diagnosis and treatment of bronchial carcinoid tumours : clinical and pathological review of 120 operated patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993;7:8-11.
- 34) Newton JN, Swerdlow AJ, dos Santos Silva IM. The epidemiology of carcinoid tumours in England and Scotland. *Br J Cancer* 1994;70:939-942.
- 35) Levi F, Te VC, Randimbison L, Rindi G, La Vecchia C. Epidemiology of carcinoid neoplasms in Vaud Switzerland, 1974-97. *Br J Cancer* 2000;83:952-955.
- 36) Modlin IM, Sandor A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumours. *Cancer* 1997;79:813-829.
- 37) Skuladottir H, Hirsch FR, Hansen HH, Olsen JH. Pulmonary neuroendocrine tumors : Incidence and prognosis of histological subtypes. A population-based study in Denmark. *Lung Cancer* 2002;37:127-135.

- 38) Okike N, Bernatz PE, Woolner LB. Carcinoid tumours of the lung. *Ann Thorac Surg* 1976;22:270-277.
- 39) Warren WH, Faber LP, Gould VE. Neuroendocrine neoplasms of the lung : a clinicopathologic update. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:321.
- 40) Yuste MG, Matilla JM, Gago TA, Duque JL, Heras F, Cerezal LJ, Ramos G. Prognostic factors in neuroendocrine lung tumors : a spanish multicenter study. *Ann Thorac Surg* 2000;70:258-260.
- 41) Dusmet ME, Mcneall MF. Pulmonary and thymic carcinoid tumors. *World J Surg* 1996;20:189-195.
- 42) Ginsberg R, Rubinstein L, Lung cancer study group. A randomized trial for lobectomy versus limited resection in patients with T1N0 non-small cell lung cancer : an overview. *Ann Thorac Surg* 1995;60:615-622.
- 43) Mills SE, Cooper PH, Walker AN, Kron IL. Atypical carcinoid tumor of the lung. A clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Surg Pathol* 1982;6:643-654.
- 44) Grote TH, Macon WR, Davis B, Greco AF, Johnson DH. Atypical carcinoid tumor of the lung. A distinct clinicopathologic entity. *Chest* 1988;93:370-375.
- 45) Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Tubin J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer* 1991;68:227-232.
- 46) Patterson GA, Cooper JD, Deslauriers J, Lerut AEMR, Luketich JD, Rice TW. *Pearson's thoracic and esophageal surgery*. 3^a ed. Elsevier 2008.
- 47) Mackley HB, Videtic GM. Primary carcinoid tumours of the lung : a role for radiotherapy. *Oncology* 2006 Nov;20(12):1537-43.

- 48) Stolz B, Smith-Jones P, Albert R, Weckbecker G, Bruns C. New somatostatin analogues for radiotherapy of somatostatin receptor expressing tumours. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31 Suppl 2:S224-6.
- 49) Simonenko VB, Dulin PA, Makanin MA. [Somatostatin analogues in treatment of gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumors]. *Klin Med (Mosk)* 2006;84(4):4-8.
- 50) Kunikowska J, Krolicki L, Cwikla J, Mikolajczak R, Pawlak D, Korsak A, et al. [Radioisotope therapy with somatostatin analogues in neuroendocrine tumours (case report)]. *Endokrynol Pol* 2005;56(1):46-54.
- 51) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic bases of disease*. 4th ed. Boston: W B Saunders Company; 1989.
- 52) Mineo TC, Guggino G, Mineo D, Vanni G, Ambrogi V. Relevance of lymph node micrometastasis in radically resected endobronchial carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg*, 2005 80:428-433.
- 53) Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classificação de tumores malignos*. 6ª ed. Rio de Janeiro. INCA, 2004.
- 54) Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind C. Classification of isolated tumour cells and micrometástasis. *Cancer* 1999;86:2668-73.
- 55) Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anat Sci Int* 2006;81(2):71-83.
- 56) Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.
- 57) Mills SE. *Histology for pathologists*. 3ª ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2007.

- 58) Ross MH, Rowrell LJ. *Histologia – texto e atlas*. 2ª ed. São Paulo. Panamericana, 1993.
- 59) Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. 3ª ed. Elsevier, 2007.
- 60) Schmidt Júnior AF, Rodrigues OR, Matheus RS, Kim JD, Jatene FB. Novas definições para distribuição, tamanho e número de linfonodos mediastinais. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2007; 33(2): 134-40.
- 61) Hong YK, Shin JW, Detmar M. Development of the Lymphatic Vascular System : a mystery unravels. *Dev Dyn*, 2004 Nov, 231(3):462-73.
- 62) Salerno CT, Frizelle S, Niehans G, Ho SB, Jakkula M, Kratzke RA, Maddaus MA. Detection of occult micrometastases in non-small cell lung carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chest* 1998;113:1526-1532.
- 63) Hashimoto T, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Tsuchiya S, Okomura S, et al. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. *Cancer Res* 2000;60:6472-6478.
- 64) Vollmer RT, Herndon JE, D’Cunha J, Abraham NZ, Solberg J, Fatourehchi M, Maruska A, Kern JA, Green MR, Kratzke RA, Maddaus MA. Immunohistochemical detection of occult lymph node metastases in non-small cell lung cancer : anatomical pathology results from Cancer and Leukemia Group B Trial 9761.
- 65) Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kodate M, Dobashi K, Oka T, Yasumoto K. Detection of micrometastatic tumor cells in pN0 Lymph nodes of patients with completely resected non-small cell lung cancer. *Ann Surg* 2002;235:133-139.
- 66) Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: John Wiley & Sons; 1990.

- 67) Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 2nd ed. Massachusetts: PWS Publishers; 1986.
- 68) Dawson B, Trapp R. *Basic and clinical biostatistics*. 2nd ed. Norwalk: Lange; 1994.
- 69) Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. Amherst: John Wiley & Sons Inc; 1989.
- 70) Wigren T, Oksanen H, Kellokumpu-Lehtinen P. A practical prognostic index for inoperable non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1997;123(5):259-66.
- 71) Torre M, Barberis M, Barbieri B, Bonacina E, Belloni P. Typical and atypical bronchial carcinoids. *Respir Med*. 1989;83(4):305-8.
- 72) Schreurs AJ, Westermann CJ, van den Bosch JM, Vanderschueren RG, Brutel de la Riviere A, Knaepen PJ. A twenty-five-year follow-up of ninety-three resected typical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;104(5):1470-5.
- 73) Houvenaeghel G, Nos C, Mignotte H, Classe JM, Giarde S, Rouanet P, Lorca FP, Jacquemier J, Bardou VJ. Micrometastasis in sentinel lymphnode in a multicentric study : predictive factors of nonsentinel lymphnode involvement. *J Clin Oncol* 2006;24:1814-22.
- 74) Yokoyama H, Nakanishi H, Kodera Y, Ikehara Y, Ohashi N, Ito Y, Koike M, Fujiwara M, Tatematsu M, Nakao A. Biological significance of isolated tumour cells and micrometastasis in lymph nodes using a green fluorescent protein – tagged human gastric cancer cell line. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):361-68.

- 75) Iglesias M, Belda J, Baldó X, Gimferrer JM, Catalán M, Rubio M, Serra M. Bronchial carcinoid tumor : a retrospective analysis of 62 surgically treated cases. *Arch Bronconeumol* 2004;40(5):218-21.
- 76) Creutzfeldt W. Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg.* 1996;20(2):126-31.
- 77) Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L, Facciolo F, Martelli M. Bronchial carcinoid tumors : nodal status and long term survival after resection. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1781-85.
- 78) Cooper DK, Belcher JR. Conservative surgery for bronchial adenomata. *Thorax.* 1976;31(1):44-8.
- 79) Silva NA, Bruno C, Arra A, D'Angelo M, Sallis N, Di Bartolo G, et al. Tumor carcinoide de pulmón: conducta terapéutica. *Rev Argent Cir.* 1988;54(5):158-66.
- 80) Izbicki JR, Passlick B, Hosch SB, Kubuschock B, Schneider C, Busch C. Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non-small cell lung cancer : significance of nodal micrometastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:623-30.
- 81) Thompson AB, Kessinger A, Sharp JG. A pilot evaluation of micrometastasis for the prediction of outcome in lung cancer. *Chest* 2004;125:156S-7S.
- 82) Davila DG, Dunn WF, Tazelaar HD, Pairolero PC. Bronchial carcinoid tumors. *Mayo Clin Proc.* 1993;68(8):795-803.
- 83) Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J.* 2001;20(4):672-82.

