

ALYNE FONSECA DE VILHENA

Análise da imunoexpressão da podoplanina (D2-40), da proteína nuclear Ki-67 e da catepsina D-34 e suas relações com metástase em pacientes operados por tumor carcinoide típico broncopulmonar

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

Programa: Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Dr. José Ribas Milanez de Campos.

Coorientador: Dr Edwin Roger Parra Cuentas.

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vilhena, Alyne Fonseca de

Análise da imunexpressão da podoplanina (D2-40), da proteína nuclear Ki-67 e da catepsina D -34 e suas relações com metástase em pacientes operados por tumor carcinoide típico broncopulmonar / Alyne Fonseca de Vilhena. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: José Ribas Milanez de Campos.

Coorientador: Edwin Roger Parra Cuentas

Descritores: 1.Tumores neuroendócrinos 2.Tumor carcinoide/patologia
3.Metástase 4.Linfangiogênese 5.Proliferação celular 6.Antígenos CD34
7.Antígeno Ki-67 8.Neoplasias brônquicas/patologia 9.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-074/14

Dedicatória

*Aos meus pais, Mathias e Sueli,
aos meus irmãos, Melyssa e Cassiano,
ao meu marido, Ewaldo,
e minha filha, Gabriela,
na tradução maior do meu afeto.*

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. João Carlos das Neves Pereira, pelo privilégio de ter compartilhado de sua companhia e de sua inquietação que transcende o lugar comum do pensamento. Por lançar-me ao conhecimento que transforma, por ter me mostrado o caminho.

Ao Prof. Dr. José Ribas Milanez de Campos, pela generosidade da acolhida, lenitivo que me infundiu ânimo em tempos de entressafra.

Ao Dr. Edwin Roger Parras Cuentas, presença benfazeja e fundamental na realização deste trabalho, pelos ensinamentos que tanto me nutriram a trajetória.

Ao Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene, pela solicitude e cordialidade em todos os momentos. Pela firmeza da decisão quanto era preciso restituir a rota.

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, por ceder a estrutura do laboratório de patologia. Pela gentileza e disponibilidade dispensadas na interpretação dos dados encontrados, decisivas para a construção de uma análise crítica dos resultados.

À Dra. Maristela Prates Rangel, pelo valioso empenho e ajuda na avaliação das lâminas.

À Dra. Andrea Anneliese Ruschmut Day, por amenizar viscissitudes de diversas maneiras.

Ao Dr. Miguel Lia Tedde, pelo convite e incentivo ao desafio. Pela colaboração na qualificação.

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Pinho Moreira, pela presença na banca de qualificação e pelas observações oportunas que tanto contribuíram para melhorias na tese.

Ao Prof. Dr. Olavo Ribeiro Rodrigues, por ampliar a minha reflexão sobre o projeto por intermédio de seu olhar atento e cuidadoso ao texto. Por ter aceito participar da banca de qualificação.

À Dra. Rosângela Monteiro, pela amizade, cortesia e orientações que tanto foram importantes para a realização deste trabalho.

A Eliane Ogata, Márcia Cristina Augusto e Aristides Tadeu Correa, pelo carinho e apoio logístico nas fases iniciais do projeto.

A Sandra Moraes Fernezlian, Esmeralda Miristene Eher e Ângela Batista dos Santos, profissionais do Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela ajuda indispensável no processamento das lâminas.

A Juliana Lattari Sobrinho, Neusa Rodrigues e Tatiane Lago, da Secretaria da Pós-Graduação, pela colaboração constante em todos os aspectos burocráticos.

Ao Prof. Dr. Jorge Montessi, mestre e amigo querido, que pela paixão de ensinar, humanismo no trato de seus pacientes e alunos fez da cirurgia torácica mais que uma disciplina no currículo, mais que um conjunto de informações acadêmicas, mas a experiência de uma escolha que para mim se fez missão.

Ao Dr. Guilherme de Carvalho Ribeiro, Dr. Marcelo de Alencar Resende e Dr. Luis Brito Filho, caríssimos amigos, pela oportunidade do trabalho em equipe e por fazerem do exercício tão desafiador de nossa especialidade um aprendizado diário, harmônico e feliz, como a vida deve ser.

*Ao Dr. Nilson Figueiredo Amaral, por me ensinar a arte do seu ofício.
Pelos estímulos questionadores que alimentam minha trajetória de
formação profissional. Por se fazer sempre presente.*

*À Dra. Carla Maria Silva e Alves, por me dispor amizade, suporte e
companhia na turbulência do caminho.*

*Ao Dr. Marcelo Militão Abrantes, do Núcleo de Apoio ao Pesquisador da
Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, pelo desvelo
imprescindível na análise estatística dos dados.*

*Ao Dr. Antônio Carlos de Barros Martins, presidente da Fundação
Hospitalar de Minas Gerais (FHEMIG), Dr. Henrique Timo Luz, diretor
assistencial, Dra Ana Cristina Mageste e sua secretária, Rita de Cássia
Nogueira da Mota, da Diretoria de Gestão de Pessoas, que por meio do
programa de capacitação de recursos humanos tornaram possível meu
afastamento temporário do Hospital Júlia Kubitscheck para a realização
do doutorado.*

*Aos colegas, funcionários e pacientes do Hospital Júlia Kubitscheck,
pelos ensinamentos constantes.*

*À Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP), por financiar este estudo.*

*Aos meus pais, Mathias e Sueli, e meus irmãos, Melyssa e Cassiano,
por construírem a família como um espaço de amor sublime onde me
fortaleço e onde é tão simples ser feliz.*

*Ao meu marido, Ewaldo, minha sorte de um amor compartilhado em
harmonia.*

À minha filha, Gabriela, por renovar minha esperança e alegria todos os dias.

Aos pacientes deste trabalho, cuja dor e cujo enfrentamento da doença não nos passaram à revelia, mas se transformaram em estímulo para buscarmos na ciência repostas que ainda não somos capazes de oferecer.

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma
humana”.*

Carl Gustav Jung.

Normatização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE GRÁFICOS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1	O sistema neuroendócrino difuso.....	06
2.2	Proliferações do sistema neuroendócrino difuso	06
2.2.1	Os tumores neuroendócrinos	06
2.2.2	Hiperplasia de células neuroendócrinas	07
2.2.3	Neoplasias neuroendócrinas pulmonares	08
2.3	Tumores carcinoides	11
2.3.1	Histórico	11
2.3.2	Tumores carcinoides broncopulmonares	12
2.3.2.1	Características clínicas	12
2.3.2.2	Diagnóstico de imagem.....	14
2.3.2.3	Diagnóstico endoscópico	16
2.3.2.4	Diagnóstico histológico	16
2.3.2.5	Fenômenos extracelulares.....	18
2.3.2.6	Fenômenos intracelulares.....	20
2.4	Tratamento.....	21
2.4.1	Tratamento cirúrgico.....	21
2.4.2	Radioterapia.....	22
2.4.3	Tratamento com radionuclídeos: terapia-alvo com microrradioterapia.....	23
2.4.4	Quimioterapia.....	23
2.4.5	Terapias antilinfangiogênicas em câncer.....	24
2.5	Marcadores biomoleculares.....	24
2.5.1	Podoplanina (D2-40).....	24
2.5.2	Proteína nuclear Ki -67.....	28
2.5.3	Catepsina D-34.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivos primários.....	32

3.2	Objetivos secundários.....	32
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33
4.1	Parecer ético.....	34
4.2	Desenho do estudo.....	34
4.3	Critérios de inclusão.....	34
4.4	Critérios de exclusão.....	35
4.5	Descrição da casuística.....	35
4.5.1	Demografia.....	35
4.5.2	Gênero.....	35
4.5.3	Idade.....	36
4.5.4	Cirurgia realizada.....	36
4.5.5	Localização tumoral em relação à carina principal.....	36
4.5.6	Margem cirúrgica comprometida	37
4.5.7	Estádio patológico.....	37
4.5.8	Tamanho do tumor.....	38
4.5.9	Metástase linfonodal locorregional.....	38
4.5.10	Total de linfonodos dissecados no ato operatório	39
4.5.11	Metástase à distância.....	39
4.5.12	Sobrevivência e óbito	40
4.6	Método.....	40
4.6.1	Coleta de dados	40
4.6.2	Confirmação do diagnóstico histológico	41
4.6.3	Técnicas de coloração	42
4.6.3.1	Técnica imuno-histoquímica empregada na detecção de D2-40, Ki-67 e CD-34.....	42
4.6.3.2	Determinação dos índices imuno-histoquímicos	44
4.7	Análise estatística	47
5.	RESULTADOS.....	49
5.1	Quantificação dos marcadores	50
5.1.1	Quantificação do D2-40.....	50
5.1.2	Quantificação do Ki-67.....	50
5.1.3	Quantificação do CD-34.....	51
5.2	Análise da casuística.....	51
5.2.1	Variáveis da casuística e metástase linfática.....	51

5.2.2	Variáveis da casuística e metástase hematogênica.....	54
5.2.3	Variáveis da casuística e metástase hematogênica ou linfática.....	56
6	DISCUSSÃO.....	59
6.1	Abordagem crítica das limitações do estudo	60
6.1.1	Desenho epidemiológico.....	60
6.1.2	Coleta de dados.....	60
6.1.3	Uniformidade do tratamento	60
6.2	Abordagem crítica dos resultados	62
6.2.1	Variáveis clínicas.....	62
6.2.2	Variáveis clínicas e metástases.....	63
6.2.3	Marcadores e metástases.....	64
6.2.3.1	Podoplanina (D2-40).....	64
6.2.3.2	Catepsina D-34 (CD-34) e Ki-67.....	65
6.3	Considerações finais.....	66
7	CONCLUSÕES.....	67
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9	APÊNDICE.....	84

Listas

5'-NASE	5'-nucleotidase
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HTP	5-hidroxitriptofano
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANP	Peptídeo natriurético atrial
APUD	Amine precursor uptake and descarboxylation
BSA	Soro albumina bovina
CAPESQ	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD-34	Catepsina D-34
D2-40	Podoplanina
DAB	Diaminobenzamidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ed.	Edição
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDG	Fluordesoxiglicose
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GIP	Gastric inhibitory peptide
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
Ki-67	Proteína nuclear Ki-67

LEC	Lymphatic endothelial cell
LSAB	Large Streptavidin-Avidin-Biotin
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial receptor -1
MEA	Adenomatosa endócrina múltipla
MIBG	Metaiodobenzilguanidina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	cAMP-dependente proteinoquinase
PKC	Proteinoquinase C
PP	Polipancreatic peptide
PROX-1	Prospero related homebox gene-1
TNM	Tumor, node, metastasis
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
WHO	World Health Organization

Tabela 1	Cirurgias realizadas: frequência e porcentagem.....	36
Tabela 2	Estadiamento dos casos: 7 ^a edição TNM.....	37
Tabela 3	Fatores associados à metástase linfática.....	52
Tabela 4	Fatores associados à metástase linfonodal (comparação entre sítios de metástase).....	53
Tabela 5	Fatores associados à metástase hematogênica.....	54
Tabela 6	Fatores associados à metástase hematogênica.....	55
Tabela 7	Fatores associados à metástase linfática ou hematogênica.....	57
Tabela 8	Fatores associados à metástase linfática ou hematogênica...	58

Figura 1	Molécula da podoplanina.....	25
Figura 2	Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica anticorpo D2-40 em aumento de 400X.....	45
Figura 3	Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica anticorpo Ki-67 em aumento de 400X	45
Figura 4	Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica anticorpo CD-34 em aumento de 400X.....	46

- Gráfico 1** Comparação dos valores de marcação da área linfática pela podoplanina entre os grupos segundo a ocorrência de metástase linfática..... 53
- Gráfico 2** Comparação dos valores de marcação do Ki-67 entre os grupos segundo a ocorrência de metástase hematogênica..... 55

Quadro 1	Classificação dos tumores neuroendócrinos segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).....	85
Quadro 2	Critérios de Arrigoni.....	86
Quadro 3	Critérios de Travis <i>et al.</i> para distinção entre carcinoma de pequenas células e carcinoma neuroendócrino de células grandes.....	86
Quadro 4	Critérios de Travis <i>et al.</i> usados para a classificação histológica dos tumores neuroendócrinos do pulmão.....	87
Quadro 5	Características clínicas do tumor carcinoide broncopulmonar típico e atípico.....	87

Resumo

Vilhena AF. *Análise da imunexpressão da podoplanina (D2-40), da proteína nuclear Ki- 67 e da catepsina D -34 e suas relações com metástase em pacientes operados por tumor carcinoide típico broncopulmonar* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014.

Os tumores carcinoídes broncopulmonares típicos são considerados tumores de baixo grau de malignidade, o que faz com que muitas vezes seja negligenciada sua capacidade de gerar metástases e levar a óbito. A atual impossibilidade de se fazer predições fidedignas do potencial metastático para individualizar a terapêutica e o manejo clínico do paciente portador de tumor carcinoide típico muitas vezes impõe situações de dúvida nas decisões da prática clínica diária. O conhecimento das características moleculares e genéticas desses tumores é a esperança de melhor compreensão de sua história natural, da identificação de seus fatores prognósticos e da avaliação de novas propostas terapêuticas. O objetivo deste estudo foi quantificar três imunomarcadores: o D2-40, o CD-34 e o Ki-67 e avaliar se eles são capazes de prever metástase. Como informação adicional também foram avaliadas as variáveis clínicas e suas associações com metástases. Material e métodos: Foram analisados prontuários de 97 pacientes submetidos à cirurgia para tratamento de tumor carcinoide típico broncopulmonar e que apresentavam período de acompanhamento pós operatório de cinco anos completos. Foi estabelecido um banco de dados epidemiológicos, anátomopatológicos, cirúrgicos e clínicos relacionados à doença. Os blocos de parafina contendo os tumores primários, metastáticos e os linfonodos ressecados foram recuperados e reavaliados por dois patologistas para confirmação do diagnóstico histológico. Após confirmação diagnóstica foram realizadas as reações imunohistoquímicas para o D2-40, o CD34 e Ki-67. As variáveis demografia, gênero, idade, localização do tumor, tamanho do tumor, margem comprometida, total de linfonodos dissecados e a quantificação dos marcadores Ki-67, CD34 e podoplanina (área linfática e densidade) foram comparadas a cinco desfechos: metástase linfática; metástase em linfonodos hilares, peribrônquicos e pulmonares ipsilaterais (N1); metástase em linfonodos mediastinais ipsilaterais (N2); metástase hematogênica; metástase linfática ou hematogênica. Para análise estatística adotou-se o valor de significância $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$). Resultados: Há imunexpressão do D2-40, do CD-34 e do KI67 nos tumores carcinóides broncopulmonares típicos, sendo possível sua quantificação. Nessa casuística não foi detectada a relação dos mesmos com metástases. Dentre as variáveis clínicas estudadas, a margem cirúrgica comprometida apresentou associação com metástase hematogênica (Mann-Witney, $p=0,03$) e o gênero masculino apresentou associação marginal com metástase linfática ($p=0,051$).

Descritores: Tumores neuroendócrinos; Tumor carcinoide/patologia; Metástase; Linfangiogênese; Proliferação celular; Antígenos CD34; Antígeno Ki-67; Neoplasias brônquicas/patologia; imuno-histoquímica.

Summary

Vilhena AF. *Analysis of the immunoexpression of podoplanin (D2-40), of the nuclear protein Ki-67, and of cathepsin D-34 and their relation to metastasis in patients operated for typical bronchopulmonary carcinoid tumor* [thesis]. São Paulo: “Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina”; 2014.

Typical bronchopulmonary carcinoid tumors are slow-growing tumors considered to be of low malignancy, a fact that often underscores their capacity to generate metastasis that leads to death. The literature does not contain any assessment of the metastatic potential that would allow for individualized and optimized therapy that could have a positive impact upon the survival rate of patients. Genetic and biomolecular studies are the most promising venues for better comprehension of the behavior and natural history of such tumors. The objective of this investigation was to analyze three immunomarkers associated to malignancy phenotypes: D2-40, CD-34, and Ki-67, and to verify whether or not they are associated to metastasis. D2-40 is a specific marker of the proliferation of the lymphatic endothelium and allows for the quantification of lymphangiogenesis. CD-34 identifies the endothelial cells of micro vessels and quantifies angiogenesis. Ki-67 in turn is a marker of neoplasia cell proliferation. As additional information several clinical variables were scrutinized for their association to metastasis. Ninety-seven subjects were assessed herein. These had undergone surgery for typical bronchopulmonary carcinoid tumor and all had complied with a full 5-year follow-up period. The paraffin blocks containing the primary and metastatic tumors and the dried lymph nodes were recovered. Once the histologic diagnosis was confirmed immunohistochemical reactions were performed for D2-40, Ki-67, and CD-34. The variables demography, gender, age, tumor site, tumor size, compromised margin, total dissected lymph nodes and quantification of D2-40 (lymphatic area and density), Ki-67 and CD-34 markers were compared to 5 outcomes: lymphatic metastasis, metastasis in hilar, peribronchic and ipsilateral pulmonary lymph nodes (N1), metastasis in ipsilateral mediastinal lymph nodes (N2), haematogenic metastasis, and lymphatic or haematogenic metastasis. It was concluded that there is immunoexpression of D2-40, CD-34 and Ki-67 markers in typical bronchopulmonary carcinoid tumors, and their quantification was possible, but in this casuistic their relation to metastasis was not detected. Among the clinical variables that were investigated the compromised surgical margin presented association with haematogenic metastasis (Mann-Witney, $p=0.03$), and the male gender was borderline associated to lymphatic metastasis ($p=0,051$).

Descriptors: Neuroendocrine tumors; Carcinoid tumors/pathology; Metastasis; Lymphangiogenesis; Cell proliferation; Antigens, CD34; Ki-67 antigen; Bronchial neoplasms/pathology; Immunohistochemistry.

1. Introdução

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por neoplasias. Os avanços científicos e tecnológicos das últimas décadas no diagnóstico e tratamento dessa doença infelizmente não se traduziram em impacto significativo na melhora da mortalidade¹.

O conhecimento das características moleculares e genéticas das neoplasias de pulmão é a esperança de melhor compreensão de sua história natural, da identificação de seus fatores prognósticos e da avaliação de novas propostas terapêuticas².

Os tumores carcinoides típicos constituem um grupo relativamente pequeno no universo das neoplasias de pulmão, porém o fato de apresentarem crescimento lento e ainda de serem considerados de baixo grau de malignidade faz com que muitas vezes seja negligenciada sua capacidade de gerar metástases e levar a óbito³.

O manejo clínico dos pacientes portadores desses tumores muitas vezes impõe situações de dúvida nas decisões da prática clínica diária, principalmente no que diz respeito à extensão da ressecção cirúrgica e linfática.

A atual impossibilidade de se fazerem predições fidedignas do potencial metastático faz com que pacientes com tumores menos agressivos muitas vezes sejam tratados com ressecções pulmonares e linfonodais mais extensas ou que pacientes com tumores mais agressivos sejam tratados com ressecções pulmonares e linfonodais econômicas.

Há muito poucos trabalhos direcionados especificamente para o estudo dos tumores carcinoides típicos broncopulmonares, que na maioria das vezes

são analisados em pequeno número e em conjunto com outras proliferações do espectro neurodócrino.

A observação desses fatores motivou, em 2004, a criação da linha de pesquisa em carcinoides típicos broncopulmonares no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que tem como objetivo o estudo de fatores possivelmente associados a metástases. O intuito maior é viabilizar um índice numérico de risco para predição individual de metástase que possibilite tratamento adequado para cada caso, otimizando a terapêutica e contribuindo para a diminuição da mortalidade causada por essa doença.

Teses e trabalhos já publicados por pesquisadores do grupo chamam a atenção para fenômenos importantes detectados a partir da quantificação de imunomarcadores específicos e de variáveis clínicas que poderiam identificar precocemente o potencial metastático nesses tumores⁴⁻¹¹.

Embora ainda não tenha sido possível a criação de um índice de predição individual de metástase, as pesquisas já realizadas têm contribuído para o melhor entendimento da patogênese dos carcinoides típicos broncopulmonares⁴⁻¹¹.

Somando esforços aos trabalhos já realizados, o presente estudo tem como objetivo analisar três imunomarcadores: o D2-40, o Ki-67 e o CD-34 e avaliar se eles são capazes de predizer metástase nesta casuística. O D2-40 é um marcador específico de proliferação do endotélio linfático que permite a quantificação da linfangiogênese¹². O Ki-67 é um marcador de proliferação celular¹³. O CD-34 identifica as células endoteliais dos microvasos e quantifica a angiogênese¹⁴. A angiogênese, a proliferação celular e a linfangiogênese são

fenômenos associados ao fenótipo metastático de várias neoplasias humanas. A quantificação da expressão da podoplanina (D2-40) especificamente para carcinoides típicos broncopulmonares e sua relação com metástase ainda não foi descrita na literatura.

Como informação adicional também serão avaliadas as variáveis clínicas e suas associações com metástases.

2. Revisão de literatura

2.1 O sistema neuroendócrino difuso

O sistema neuroendócrino difuso é formado por células de ação endócrina, parácrina e neurócrina que se encontram dispersas nos tecidos epiteliais. Tem como sinônimos anteriormente empregados: sistema *amine precursor uptake and descarboxylation* (APUD), células argenta-fílicas e angiofílicas e células enteroendócrinas, enterocromafins ou de Kulchitsky. As células do sistema neuroendócrino difuso são especialmente encontradas nos tratos digestivo e respiratório, mas também estão presentes nas ilhotas pancreáticas, tireoide, timo, pele, trato urogenital e biliar^{15,16}.

Essas células têm como características principais a captação e a descarboxilação de compostos precursores de aminas e produção de hormônios e peptídeos ativos. Entre eles destacam-se a gastrina, secretina, colecistoquinina, epinefrina, norepinefrina, serotonina (5-hidroxitriptamina), enteroglucagon, somatostatina, substância P, *vasoactive intestinal peptide* (VIP) bombesina, *gastric inhibitory peptide* (GIP), motilina e *polipancreatic peptide* (PP). Tais compostos são liberados por via parácrina (ação local em células próximas por difusão), endócrina (ação à distância via corrente sanguínea) e neurócrina (desencadeiam potenciais de ação em neurônios próximos)¹⁵⁻¹⁷.

2.2 Proliferações do sistema neuroendócrino difuso

2.2.1 Os tumores neuroendócrinos

Os tumores neuroendócrinos são proliferações de células situadas em glândulas endócrinas com elementos de tecido nervoso ou de células

pertencentes ao sistema neuroendócrino difuso. O termo tumor do sistema neuroendócrino difuso refere-se a carcinomas que se encontram no grupo dos tumores neuroendócrinos disseminados.^{18,19} O Quadro 1 (APÊNDICE A) mostra a classificação dos tumores neuroendócrinos segundo classificação da Organização Mundial de Saúde.²⁰

2.2.2 Hiperplasia de células neuroendócrinas

A hiperplasia de células neuroendócrinas agrupadas e com diâmetro menor que 5 mm são denominadas de “*tumorlets*”^{21,22}.

Algumas situações tais como altas concentrações de gás carbônico, baixa concentração de oxigênio bem como neoplasias, infecções ou processos inflamatórios podem levar a essas hiperplasias²²⁻²⁴.

Os “*tumorlets*” são evidenciados em cerca de 7 a 10% dos pacientes com tumores carcinoides, mas também são encontrados em indivíduos sem tumores carcinoides²⁵⁻²⁸. São mais comuns no gênero feminino em idade mais avançada^{25,26}.

Não existem evidências de que essas hiperplasias sejam proliferações pré-malignas²². O que ocorre é que os “*tumorlets*”, na verdade, não diferem dos tumores carcinoides típicos do ponto de vista celular²⁹, portanto, o que é classificado “*tumorlet*” baseado apenas no diâmetro pode, na verdade, tratar-se futuramente de um carcoide típico^{25,30}.

Há relato na literatura de metástase linfonodal de “*tumorlet*”³¹ e de tendência à piora da sobrevida em cinco anos nos pacientes portadores dessa

hiperplasia²⁶, porém o significado clínico da presença dos “tumorlets” ainda precisa ser melhor esclarecido.

2.2.3 Neoplasias neuroendócrinas pulmonares

As neoplasias neuroendócrinas pulmonares originam-se de células neuroendócrinas distribuídas ao longo de todo o epitélio broncopulmonar, que se encontram ora em grupos (corpos de kulschitsky), ora de maneira isolada (células de Kulschitsky)³².

Tais células localizam-se principalmente nos brônquios lobares e principais e raramente nas regiões carinal e periférica³³.

O espectro das proliferações celulares neuroendócrinas compreende desde a hiperplasia difusa das células neuroendócrinas^{22,34}, os tumores carcinoides broncopulmonares típicos e atípicos até proliferações de alto grau de malignidade como os carcinomas neuroendócrinos de grandes e pequenas células³⁵.

Os tumores neuroendócrinos do pulmão são representados por esse amplo espectro de entidades patológicas, atualmente classificados de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores de pulmão de 2004³⁵.

A primeira classificação universalmente aceita para os tumores neuroendócrinos de pulmão foi a da Organização Mundial da Saúde de 1981³⁶, ocasião em que pela primeira vez os tumores carcinoides do pulmão foram considerados neoplasias malignas e classificados de acordo com os critérios de Arrigoni³⁷ (QUADRO 2 – APÊNDICE A).

Os tumores neuroendócrinos de pulmão foram classificados pela Organização Mundial de Saúde, em 1981³⁶, como:

- a) Tumores carcinoides típicos;
- b) tumores carcinoides de células pequenas tipo intermediário;
- c) *oat cell carcinoma*;
- d) carcinoma de células pequenas combinado com carcinoma escamocelular ou adenocarcinoma.

Estudo realizado em 1986 por Delmonte Capelozzi *et al.* evidenciou características imuno-histoquímicas e neuroendócrinas em carcinomas de células grandes, sugerindo que uma subclassificação poderia ser útil no tratamento e prognóstico dos pacientes³⁸.

Em 1991, Travis *et al.* sugeriram que a denominação de carcinoma neuroendócrino de células grandes deveria ser incluída na classificação das neoplasias neuroendócrinas do pulmão e propuseram critérios de distinção entre o carcinoma de células pequenas e carcinoma neuroendócrino de células grandes³⁹ (QUADRO 3 – APÊNDICE A).

Em 1997, Dresler *et al.*⁴⁰ analisaram 40 casos de carcinoma neuroendócrino de células grandes e sugeriram que lesões anteriormente denominadas carcinoma neuroendócrino de células grandes deveriam, na verdade, ser classificadas como carcinoma de células grandes com diferenciação neuroendócrina, pois embora tivessem características neuroendócrinas tinham baixa reatividade aos marcadores neuroendócrinos à imuno-histoquímica.

A Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - WHO) e a Associação Internacional para estudo do Câncer de Pulmão (IASLC)

fizeram, em 1999, a primeira revisão da classificação desde 1981, considerando a categorização dos tumores neuroendócrinos baseados nos critérios histológicos de Travis *et al.* Nessa ocasião reconheceram o carcinoma neuroendócrino de células grandes como um tipo de carcinoma de células grandes com morfologia neuroendócrina e evidência imuno-histoquímica de diferenciação neuroendócrina^{41,42} (QUADRO 4 – APÊNDICE A).

Há na literatura grande confusão sobre o uso dos termos diferenciação neuroendócrina e morfologia neuroendócrina³⁰. Embora haja várias séries investigadas sobre os carcinomas neuroendócrinos de células grandes^{40,43-47}, nem sempre há rigorosa aplicação dos critérios da OMS³⁰, o que dificulta a elucidação da importância clínica e biológica dessa subclassificação. Apesar disso, trabalhos evidenciam a diferença do comportamento clínico entre eles.

Ab'saber *et al.* relataram sobrevivência similar entre o carcinoma de células grandes e o carcinoma de células grandes com morfologia neuroendócrina em tumores ressecados⁴⁵. Porém, Przygodzki *et al.* demonstraram que o carcinoma neuroendócrino de células grandes e o carcinoma de células grandes com diferenciação neuroendócrina são clinicamente mais agressivos que os carcinomas de células grandes⁴⁶. Iyoda *et al.* sugeriram que a identificação das características neuroendócrinas devem ser melhor investigadas por sua provável relação com a evolução clínica⁴⁷.

Em 2004, a classificação de 1999 foi revista pela OMS, mantendo-se os critérios de classificação dos tumores neuroendócrinos de pulmão. É a classificação em vigor até hoje⁴¹.

2.3 Tumores carcinoídes

2.3.1 Histórico

O termo carcinoíde (*karzinoíde*) significa “semelhante a carcinoma” e foi inicialmente descrito em 1907 pelo médico alemão Siegfried Obberdorfen, da Universidade de Munique, para denominar tumores encontrados nos segmentos broncopulmonares ou no trato gastrintestinal que, apesar de se assemelharem morfológicamente aos carcinomas, apresentavam comportamento menos agressivo⁴⁸.

Em 1914, Gosset e Masson atentaram para as propriedades neuroendócrinas desses tumores⁴⁹.

A distinção entre carcinoíde típico e atípico foi inicialmente citada por Englebreth-Holm, em 1944⁵⁰.

Em 1954, Soutter *et al.* chamaram a atenção para o fato de que entidades patológicas com graus distintos de malignidade agrupadas sob o termo de adenomas eram tratadas de forma padrão, com cirurgias radicais⁵¹.

A despeito desses relatos, os tumores carcinoídes foram ainda por muito tempo considerados adenomas. Em 1963, artigo do Massachusetts General Hospital ainda incluía como adenomas brônquicos três entidades distintas: os tumores carcinoídes, os mucoepidermóides e o carcinoma adenoíde cístico (“cilindromas”)⁵².

Arrigoni *et al.* (1972) propuseram critérios histológicos para distinguir esses tumores. Carcinoídes típicos e atípicos foram classificados em tumores distintos com características histológicas e prognósticos diferentes³⁷.

Somente em 1982 a OMS classificou de forma definitiva os tumores carcinoides como neoplasias malignas, dividindo-os em típico e atípico segundo os critérios de Arrigoni *et al.*³⁷.

O padrão atual de classificação dos tumores carcinoides é a da OMS de 2004 baseada nos critérios de Travis *et al.* e descrita anteriormente⁴¹.

2.3.2 Tumores carcinoides broncopulmonares

O pulmão é o segundo sítio mais frequente de tumores carcinoides, precedido apenas pelo trato gastrintestinal. Os tumores carcinoides broncopulmonares correspondem a 0,3 a 4% das neoplasias de pulmão ressecadas⁵³⁻⁵⁵.

2.3.2.1 Características clínicas

A idade dos pacientes portadores de tumores carcinoides broncopulmonares tem ampla distribuição, com variações de acordo com cada série estudada na literatura. Observa-se, em geral, distribuição bimodal, com picos entre 35 e 55 anos, cujo pico precoce corresponde a indivíduos jovens com carcinoides típicos e o pico tardio é explicado pela frequência mais alta de carcinoides atípicos em pacientes com idade mais avançada⁵⁶.

A proporção entre os gêneros é similar. A prevalência da doença entre tabagistas e a população geral não mostra diferença significativa, embora haja alguns trabalhos que mostrem proporção um pouco maior de pacientes tabagistas em portadores de carcinoides broncopulmonares atípicos⁵⁶.

Um terço dos pacientes é assintomático ao diagnóstico. Os sinais e sintomas dependem da localização do tumor. Os tumores periféricos correspondem a cerca de 20% dos carcinoides e são em geral assintomáticos e usualmente são achados incidentais. A localização central é a mais frequente (60% em brônquios lobares e 20% em brônquios principais). Os tumores centrais podem manifestar-se com tosse, hemoptise e infecções de repetição. Algumas vezes o diagnóstico é confundido com asma ou bronquite crônica. Bronquiectasia e abscessos pulmonares podem ser consequência da obstrução brônquica crônica. Raramente o diagnóstico é feito a partir de metástases⁵⁶⁻⁵⁸.

A apresentação clínica pode ter características distintas entre os tumores carcinoides broncopulmonares típicos e atípicos, como as descritas no Quadro 5 (APÊNDICE A).

As síndromes paraneoplásicas são infrequentes tanto nos carcinoides broncopulmonares típicos quanto nos atípicos. Incluem síndrome carcinoide, de Cushing e síndrome adenomatosa endócrina múltipla (MEA)⁵⁹.

A incidência da síndrome carcinoide maligna em carcinoides broncopulmonares típicos é de menos de 1% e nesses casos o diagnóstico a partir dela é raro e geralmente está associado a tumores com mais de 5 cm ou metástases hepáticas⁵⁹⁻⁶².

Os tumores neuroendócrinos são capazes de sintetizar, armazenar e às vezes secretar inúmeras substâncias biologicamente ativas. A produção dessas substâncias pode resultar em várias síndromes clínicas, como a síndrome carcinoide, que apesar de muito rica em sintomas possui dois deles como muito característicos: a diarreia e o rubor (*flushing*). Esses sintomas

sempre ocorrem em concomitância. Outros incluem doença valvar, espasmos, telangiectasias, broncoespasmo, edema, cianose, pelagra e artrite^{59,63}.

O diagnóstico laboratorial da síndrome carcinoide pode ser obtido a partir da dosagem de serotonina ou da cromogranina A séricas ou pela pesquisa na urina do 5-HIAA, um dos metabólitos da serotonina. A serotonina plasmática e a plaquetária estão elevadas e isso se reflete no aumento de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) na urina^{60,64}.

A cromogranina A é uma proteína hidrófila presente nos grânulos das células neuroendócrinas. Sua dosagem sanguínea pode ser detectada em tumores funcionantes ou não, com sensibilidade de 68% e especificidade de 86%. Já a pesquisa do 5-HIAA, embora tenha menos sensibilidade (em torno de 35%), tem especificidade de 100%^{60,65,66}.

O tratamento da síndrome carcinoide deve ser baseado em sintomáticos (antidiarreicos, bloqueadores de serotonina - 5HT₃ - e análogos da somatostatina); e após o controle do quadro agudo deve-se optar pelo tratamento do tumor⁶⁷.

2.3.2.2 Diagnóstico de imagem

A radiografia de tórax revela massa periférica ou alterações no parênquima pulmonar decorrentes da obstrução brônquica. A tomografia de tórax mostra massa central ou periférica de contornos definidos (carcinoides típicos) ou irregulares (carcinoides atípicos), que podem apresentar calcificações puntiformes (30%) e também lesão endobrônquica, lesões parenquimatosas decorrentes de obstrução da árvore brônquica e linfadenomegalias. A fluordesoxiglicose - tomografia por emissão de pósitrons

(FDG-PET) tem valor limitado devido ao fato de os tumores carcinoides não serem hipermetabólicos^{56,57}. Estudos ainda experimentais usando outros marcadores como o 18-F-diidroxi-fenilalanina-PET e 11C-5-HTP-PET têm informado elevada taxa de detecção e localização dos carcinoides⁶⁸.

A cintilografia utilizando o octreotídeo radiomarcado, método conhecido como octreoscan⁶⁷, é um exame sensível e específico para a detecção de tumores carcinoides, variando de 80 a 100% de sensibilidade⁶⁹⁻⁷¹.

Esse exame utiliza um análogo da somatostatina (octreotídeo) adicionado a uma molécula de radionuclídeo (11-Índium-dietilene-triamina ácido pentacético), que tem alta afinidade pelos receptores da somatostatina tipos 2 e 5⁷².

Um terço dos tumores carcinoides broncopulmonares em geral não apresenta receptores de somatostatina⁷³.

Tese realizada em nosso meio por Fernando Moura Silva, que acompanhou 62 pacientes franceses, enfatizou que 58,1% dos tumores carcinoides broncopulmonares típicos possuem receptor de somatostatina tipo 2¹⁰.

O octreoscan tem a capacidade de mapeamento do corpo total, inclusive o cérebro, pois não utiliza a glicose como carreador e é útil para localizar metástases e doença multifocal e pode complementar o diagnóstico em situações clínicas nas quais o método radiológico é insuficiente. Não é um exame de rotina recomendado para diagnóstico de tumores carcinoides broncopulmonares, tendo sua indicação em situações específicas, como a localização de tumores não detectáveis à tomografia de tórax^{73,74}.

A cintilografia com metaiodobenzilguanidina (MIBG) é uma alternativa ao octreoscan também, porém com menos sensibilidade⁷⁵.

2.3.2.3 Diagnóstico endoscópico

A broncoscopia flexível é método diagnóstico muito útil na identificação dos tumores centrais. As lesões endobrônquicas são, em geral, bem vascularizadas e podem ter aspecto polipoide protundindo na árvore brônquica em aspecto de “dedo de luva”. Durante muito tempo a biopsia dessas lesões não foi recomendada, devido ao risco de hemoptise^{52,76}.

Hoje está bem estabelecido que a biopsia da lesão endobrônquica realizada cuidadosamente é método seguro⁷⁷ e de alta acurácia. O aspirado brônquico, o lavado broncoalveolar e o escovado da lesão geralmente não são úteis. Na biopsia transbrônquica, assim como na punção transtorácica, é frequente a confusão com carcinoma de células pequenas.

2.3.2.4 Diagnóstico histológico

- **Critérios histopatológicos clássicos**

O diagnóstico histopatológico dos tumores carcinoides broncopulmonares definido pelos critérios clássicos a partir da microscopia óptica já foi motivo de ampla discussão anteriormente. Eles são os critérios mais importantes na diferenciação dos tumores neuroendócrinos^{41,42}.

Na microscopia eletrônica, as características nucleares, citoplasmáticas e granulares comuns a esses tumores impedem essa diferenciação. Exceção

se faz a tumores carcinoides típicos e carcinomas neuroendócrinos de células pequenas. Nesse caso, a presença de grânulos citoplásmicos secretores abundantes, densos, heterogêneos e ligados à membrana caracteriza os tumores carcinoides típicos⁷⁸.

- **Crítérios histopatológicos de agressividade**

O atual aprofundamento no conhecimento da biologia molecular, genética e patologia dos tumores possibilitou o entendimento de que os critérios histopatológicos clássicos (número de mitoses, necrose e atipia celular) detectados à hematoxilina e eosina não são suficientes para determinar o potencial de agressividade das neoplasias⁷⁹⁻⁸¹.

Os métodos imuno-histoquímicos e a análise do genoma celular podem identificar tendências do tumor a gerar metástases ou invasão local a partir da análise dos seguintes aspectos:

- a) indução de linfangiogênese e angiogênese pelas células tumorais^{82,83}.
- b) potencial proliferativo de células⁸⁴;
- c) Integridade das proteínas de reparo do genoma⁸⁵;
- d) capacidade de indução de apoptose em células indiferenciadas malignas;⁸⁶
- e) capacidade das células tumorais de escaparem ao ataque de células do sistema imunológico;
- f) eficácia do avanço das células malignas através das fibras da matriz extracelular⁸⁷;

Tais fenômenos não podem ser evidenciados de forma precoce na análise histológica padrão dos tumores^{85,88,89}.

2.3.2.5 Fenômenos extracelulares

No meio extracelular, o potencial invasivo e metastático dos tumores é determinado pelas interações entre as células neoplásicas e a matriz citoplasmática^{87,90-94}.

Para que haja invasão de células tumorais nos tecidos adjacentes é necessário que a integridade da membrana basal da célula e a barreira formada pelas fibras colágenas e elásticas na matriz sejam rompidas. As células tumorais causam desequilíbrio entre a produção e a degradação dos componentes da matriz extracelular^{95,96}.

Podem produzir enzimas que digerem as fibras colágenas, elásticas e outros componentes matriciais, permitindo que células malignas entrem em contato com vasos sanguíneos e linfáticos, podendo, então, gerar metástases^{97,98}. A quantificação imuno-histoquímica dessas enzimas é um campo de estudo aberto à compreensão desses fenômenos e de sua relação com o potencial de agressividade dos tumores.

As células malignas também podem estimular a deposição de fibras colágenas e elásticas ao redor do tumor, fenômenos denominados, respectivamente, de reação desmoplásica e elastótica^{93,99,100}.

João Carlos das Neves Pereira (2004) demonstrou que a densidade de fibras elásticas e colágenas é maior em tumores carcinoides típicos que não geram metástase⁵, corroborando a hipótese de que tumores envoltos por malhas bem definidas teriam menos capacidade de atingir tecidos adjacentes e gerar metástase⁹⁶.

As fibras colágenas, em especial o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, interagem com os fenômenos que determinam a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos, fundamentais para a nutrição e crescimento do tumor e ocorrência de metástase^{101,102}.

O colágeno tipo IV tem importância na inibição da angiogênese¹⁰³.

A) Linfangiogênese

A identificação e a quantificação de marcadores específicos para o endotélio linfático neoformado têm possibilitado o estudo dos fenômenos moleculares envolvidos na formação desses vasos, na disseminação das células malignas, bem como do papel da linfangiogênese na ocorrência de metástases¹⁰⁴.

Os marcadores de vasos linfáticos mais utilizados para o estudo da linfangiogênese são o *vascular endothelial growth factor* (VEGF-C) e seu receptor *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR-3), o *lymphatic vessel endothelial receptor -1* (LYVE-1), a 5'-nucleotidase (5'Nase) e a podoplanina (D2-40). O significado clínico e fisiológico da linfangiogênese ainda não está totalmente definido e tem sido alvo de vários estudos^{104,105}.

Em nosso meio, Mariana Laloni acompanhou 182 pacientes brasileiros e franceses operados por tumor carcinoide típico broncopulmonar e concluiu que, embora tenha havido expressão do LYVE-1, não foi possível prever metástase baseado na quantidade de imunoexpressão do LYVE-1⁶.

A quantificação da expressão da podoplanina (D2-40) especificamente para carcinoides típicos broncopulmonares e sua relação com metástase ainda não foi descrita na literatura.

B) Angiogênese

Para o suprimento das células neoplásicas o tecido tumoral necessita de novos vasos arteriais e venosos^{106,107}.

O processo de formação de novos vasos sanguíneos é denominado angiogênese^{106,107}.

Esse é um fenômeno intimamente ligado ao aumento da massa tumoral e pode estar correlacionado à existência de metástases¹⁰⁸⁻¹¹¹.

O marcador de angiogênese mais utilizado na prática clínica é o CD-34 (catepsina D-34). Estudos prévios nessa linha de pesquisa ressaltaram correlação entre a dosagem de CD-34 e metástase em tumores carcinoides típicos brocopulmonares^{5,9}. O reconhecimento do mecanismo molecular que regula a formação de novos vasos patológicos sanguíneos e linfáticos é de extrema importância para a determinação do potencial invasivo e metastático dos tumores, bem como para o estabelecimento de terapias antiangiogênicas.

2.3.2.65 Fenômenos intracelulares

Os fenômenos intracelulares que se relacionam com o potencial de agressividade do tecido tumoral podem ser quantificados por imuno-histoquímica ou pelo estudo de alterações no genoma. Na prática clínica, as análises imuno-histoquímicas são realizadas com mais frequência. O potencial proliferativo das células tumorais pode ser avaliado a partir da quantificação da expressão imuno-histoquímica de proteínas nucleares como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o Ki-67. Sua relação com o potencial

agressivo dos tumores já foi estudada nos carcinomas neuroendócrinos^{4,9,112,113}.

A tese João Carlos das Neves Pereira, que motivou e abriu caminhos para novos estudos na mesma linha de pesquisa na qual se insere este trabalho, demonstrou que os fenômenos intracelulares identificados pela quantificação do marcador Ki-67 tinham relação com metástases numa coorte de 55 pacientes brasileiros operados por tumores carcinoides típicos⁵.

2.4 Tratamento

2.4.1 Tratamento cirúrgico

A cirurgia é o tratamento de escolha para os tumores carcinoides^{56,57}.

A extensão da ressecção e o tipo de dissecação linfática ainda são controversos¹¹⁴⁻¹¹⁷.

A ressecção endoscópica não é recomendável como tratamento primário, pois a recorrência local e a remoção incompleta são frequentes^{56,57}.

O comportamento dos tumores carcinoides atípicos é mais agressivo, justificando a abordagem cirúrgica com ressecção anatômica padrão, lobectomia ou pneumonectomia seguidas de dissecação linfática hilar e mediastinal de rotina^{56,57,115,117}.

As ressecções econômicas tais como em cunha ou segmentectomia são ainda hoje consideradas apropriadas para tumores carcinoides típicos periféricos sem metástase linfática, bem como a broncoplastia nos tumores carcinoides típicos centrais^{56,57,114-116,118}. Porém, atualmente é bem definido que mesmo os tumores carcinoides típicos podem apresentar metástases

hematogênicas e linfáticas em até 15% dos casos e ter curso letal com mortalidade de até 10% dos casos em cinco anos¹¹⁸⁻¹²². A uniformidade na conduta cirúrgica sem considerar o risco individual da ocorrência de invasão de tecidos adjacentes ou de metástases traz o risco de considerar todos os carcinoides típicos como lesões pouco agressivas e tratá-las de forma insuficiente com ressecções econômicas ou, então, se forem todos considerados indiscriminadamente como malignos, incorre-se no erro de submeter pacientes com lesões pouco agressivas a procedimentos extensos, com aumento da morbidade^{56,57,114,115,118}.

Vários trabalhos têm sido feitos para tentar definir critérios prognósticos clínicos, histológicos, imuno-histoquímicos e de biologia molecular capazes de diagnosticar um subgrupo de tumores carcinoides típicos com potencial metastático a fim de propor abordagem terapêutica mais eficiente com individualização da conduta cirúrgica^{5,8,123}.

2.4.2 Radioterapia

Carcinoides brônquicos são, em geral, resistentes à radioterapia convencional. A radioterapia pode ser indicada para pacientes com carcinoide atípico operado com margens exíguas ou com metástases linfáticas, embora o resultado desse tratamento não seja bem definido. No entanto, pode-se obter palição efetiva em pacientes portadores de metástases ósseas ou em sistema nervoso central^{56,57}.

2.4.3 Tratamento com radionuclídeos: terapia-alvo com microrradioterapia

A terapia-alvo utiliza radionuclídeos acoplados aos análogos sintéticos da somatostatina via endovenosa, levando a necrose celular e indução da apoptose¹²⁴.

Os análogos sintéticos da somatostatina mais utilizados na prática clínica são o octreotide, lanreotide, vapreotide e seglitide¹²⁵⁻¹²⁷.

Os radionuclídeos mais aplicados são o Ytrio-90 e o Lutécio-177¹²⁸.

Há relatos de resultados positivos em pacientes com tumores neuroendócrinos metastáticos que expressam receptores principalmente tipo 2 de somatostatina com octreotide marcado com 90-Ytrium, lanreotide acoplado com 90-Ytrium e octreotate marcado com Lutécio-177¹²⁹.

2.4.4 Quimioterapia

A quimioterapia clássica no tratamento dos tumores carcinoides apresenta, em geral, baixas taxas de resposta global ao tratamento, alta toxicidade e ausência de benefício no tempo de sobrevivência global^{130,131}.

O esquema quimioterápico similar ao usado no carcinoma de pequenas células, com etoposídeo e cisplatina, demonstrou boa resposta em cerca de 60% dos casos em tumores carcinoides com comportamento agressivo, porém ausência de resposta em pacientes com tumores carcinoides típicos¹³².

A quimioterapia, quando usada no manejo das metástases, gera elevados índices de toxicidade e resposta não tão efetiva quanto nos carcinomas de pequenas células, embora alguns autores recomendem quimioterapia adjuvante no carcinoide atípico com metástase linfática^{64,57,130,131}.

A quimioterapia pode estar indicada aos pacientes com doença em que tumores volumosos comprometem a função do órgão envolvido ou aos pacientes com sintomas graves da síndrome carcinoide que não responderam às outras modalidades de tratamento¹³¹.

A microquimioterapia guiada por análogos da somatostatina vem sendo alvo de estudos, mas ainda não tem aplicabilidade clínica nos tumores carcinoides típicos broncopulmonares.

2.4.5 Terapias antilinfangiogênicas em câncer

As drogas com potencial antilinfangiogênico ainda não estão disponíveis para o tratamento dos tumores carcinoides.

Estudos que proporcionem melhor entendimento dos marcadores específicos para linfangiogênese e seus sítios de ligação são uma esperança no desenvolvimento dessas drogas e uma futura possibilidade de alteração do curso natural dessa doença.

2.5 Marcadores biomoleculares

2.5.1 Podoplanina (D2-40)

A podoplanina é uma glicoproteína pequena, tipo mucina, associada à membrana celular inicialmente identificada em podócitos glomerulares, específica dos endotélios linfáticos. Estudos de sequenciamento de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) humano evidenciaram que a podoplanina era idêntica a outras proteínas já relatadas, tais como o T1-alfa (expresso pelas células epiteliais alveolares tipo I) e o PA2.26 (identificado na

pele de ratos durante carcinogênese induzida). Portanto, são consideradas sinônimos as denominações T1-alfa e antígeno PA2.26, bem como gp 38 ou Aggrus^{12,133}.

A caracterização bioquímica da molécula da podoplanina revela uma pequena proteína glicosilada tipo sialomucina, composta de 172 aminoácidos. Contém em sua estrutura ácido siálico associado a galactose e N-acetil galactosamina. É hidrofóbica. É uma proteína transmembrana, seu domínio extracelular é um suposto sítio da N-glicosilação e os resíduos da O-glicosilação (serina e threonine) são encontrados de forma abundante. Sua porção citoplasmática é formada por nove aminoácidos e é um sítio potencial de fosforilação para o cAMP-dependente proteinoquinase (PKA) e proteinoquinase C (PKC). Os genes da podoplanina são encontrados nos cromossomos 1 (humanos) e 4 (ratos)¹².

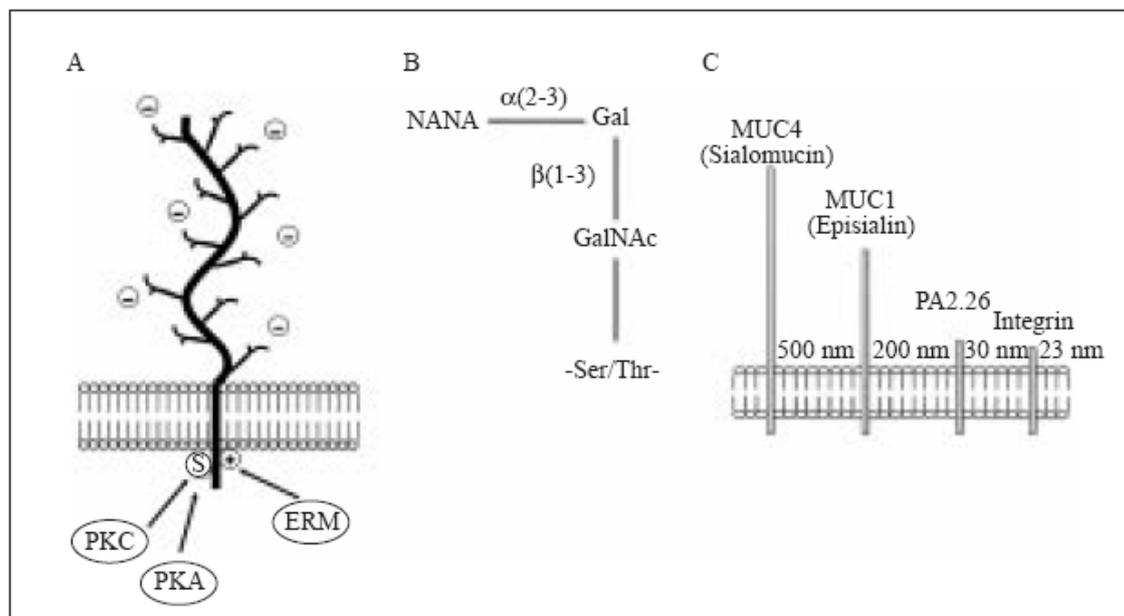


Figura 1 - Molécula da podoplanina

FONTE: Villar *et al.* (2003)¹².

A podoplanina é um marcador linfático específico¹⁴³ e é um dos indutores primários do gene Prox-1^{134,135}.

O *prospero related homebox gene-1* (Prox-1) é um gene marcador da subpopulação de células endoteliais que surgem no sistema linfático durante o desenvolvimento precoce. Parece ser o maior gene controlador das células linfáticas epiteliais através da repressão da expressão de genes específicos das células endoteliais dos vasos sanguíneos e indução da transcrição do gene do endotélio linfático. O Prox-1 é mapeado no cromossomo humano 1 q32.2-q32.3. A deleção do gene Prox-1 não afeta o desenvolvimento do sistema vascular sanguíneo, mas promove o desenvolvimento dos vasos linfáticos, sugerindo que ele é fundamental para o desenvolvimento dos mesmos. Portanto, a podoplanina é um marcador da linfangiogênese^{135,136}.

Em tecidos sãos de camundongos, Schacht *et al.* observaram que a deficiência de podoplanina gera desenvolvimento anormal dos vasos linfáticos, causando linfedema¹³⁷.

A podoplanina nos tecidos neoplásicos foi inicialmente identificada por Gandarillas *et al.* (1997) em modelos experimentais em ratos com carcinogênese induzida na pele. A podoplanina era ausente na epiderme normal, bem como nas culturas de queratinócitos normais, porém era abundante nas células tumorais e em cultura de fibroblastos¹³⁸.

Ao avaliarem os angiossarcomas de origem mista (endotelial capilar e linfática), Breiteneder-Geleff *et al.* (1999) demonstraram que a podoplanina é um marcador linfático específico em tecidos tumorais¹³⁴.

A descoberta dos marcadores linfáticos específicos tem contribuído para a elucidação dos mecanismos de metástase linfática que podem ocorrer

ou pela invasão dos linfáticos peritumorais preexistentes ou por indução tumoral de novos linfáticos (linfangiogênese).

Nos tecidos neoplásicos, a podoplanina é associada a metástases, à agregação plaquetária induzida pelo tumor e à linfangiogênese.

A partir do estudo da reação da podoplanina com o anticorpo 8F11 (sabidamente um neutralizador da agregação plaquetária) em cepas de camundongos clonados portadores de metástases de carcinoma colorretal e da comparação do nível de podoplanina humana em 160 pares de cDNA e mRNA em tecidos tumorais e normais, confirmado por imuno-histoquímica, Kato *et al.* salientaram em seus relatos publicados em 2003 que a podoplanina é um fator de indução de agregação plaquetária presente na superfície do tumor e que tal indução não depende de outros componentes plasmáticos¹³⁹.

Com base no estudo imuno-histoquímico da podoplanina, Schimid *et al.* (2005) avaliaram 120 espécimes de pacientes portadores de tumores neuroendócrinos, compararam a invasão linfática e parâmetros clínicos e apuraram invasão linfática mais acentuada em tumores de elevado grau de agressividade e em estágios avançados, concluindo que a avaliação da invasão linfática é importante fator prognóstico nos tumores neuroendócrinos do pulmão. Cabe ressaltar que neste trabalho os tumores do espectro neuroendócrino são avaliados em conjunto¹⁴⁰.

A expressão imuno-histoquímica da podoplanina foi investigada por em Kono *et al.* (2006) em vários tipos de células tumorais humanas, encontrando-a presente em vasos linfáticos de tumores de fígado, esôfago, cólon, mama e pulmão, sugerindo que a podoplanina está envolvida na progressão de diversos tumores¹³³.

Kunita *et al.* (2007) contribuíram para o estabelecimento da constatação da associação entre a podoplanina e a agregação plaquetária ao estudarem a expressão da podoplanina em células ovarianas de *hamster* chineses, promovendo metástases pulmonares tanto em modelos experimentais quanto espontâneos. Nesse mesmo trabalho, a administração da aspirina reduziu o número de focos metastáticos¹⁴¹.

A elucidação dos mecanismos que determinam a progressão do tumor cria perspectivas para o entendimento dos processos de disseminação tumoral linfática e desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, como terapias antilinfagiógênicas e antiagregantes plaquetários no controle da progressão dos tumores.

2.5.2 Proteína nuclear Ki-67

A proteína Ki-67 é um anticorpo monoclonal inicialmente descrito em 1983 por Johannes Gerdes durante estudo de reações antígeno-anticorpo específicas para linfomas de Hodgkin e células de Reed-Stenberg¹⁴²⁻¹⁴⁴.

A expressão da proteína Ki-67 em células humanas normais ou tumorais está estritamente associada à proliferação celular.

É identificada em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose). Não é identificada em G0. Isso torna o Ki-67 um excelente marcador clínico de fator de crescimento da população celular¹⁴⁵.

Sua localização pode variar. Durante a interfase, é detectada exclusivamente no núcleo das células, mas durante a mitose pode ser identificada na superfície dos cromossomos^{14,145-148}.

É um marcador bastante estudado nos tumores neuroendócrinos. Nos tumores de pulmão tem sido avaliado tanto para diagnóstico diferencial entre a grade neuroendócrina como para prognóstico. No caso do diagnóstico diferencial entre carcinoides típicos e atípicos, a variabilidade obtida no valor das quantificações é muito diverso, o que ainda dificulta a identificação de um índice efetivo capaz de diferenciá-los.

Estudos recentes, como o de Pelosi *et al.*, têm chamado a atenção para a necessidade de padronização da metodologia da quantificação do Ki-67 a fim de possibilitar sua aplicabilidade clínica¹⁴⁹.

Como fator prognóstico, a expressão do Ki-67 já foi descrita como fator independente em tumores de mama, melanoma e linfoma não Hodgkin¹⁵⁰.

Em tumores neuroendócrinos do trato digestivo é relatado como um importante fator prognóstico de recorrência¹⁵¹.

A evidência do Ki-67 como marcador prognóstico nos tumores neuroendócrinos do pulmão já foi relatada na literatura, porém se observa, além do problema do uso de diferentes metodologias na quantificação desse imunomarcador, o importante fato de os vários tumores da grade neuroendócrina serem estudados em conjunto, inviabilizando significado clínico claro desse marcador como fator prognóstico^{8,9,140}.

2.5.3 Catepsina D34

A catepsina D-34 é uma glicoproteína transmembrana presente em células endoteliais, células progenitoras hematopoiéticas, fibroblastos embrionários e algumas células do tecido nervoso fetal e adulto. Sua quantificação é de grande importância clínica, pois o uso de anticorpos que se

ligam a epítomos de moléculas da catepsina D-34 em células endoteliais dos vasos sanguíneos neoformados possibilita a identificação imuno-histoquímica e a quantificação de angiogênese na prática clínica^{13,152}.

Níveis aumentados de catepsina D em neoplasias humanas vêm sendo descritas há mais de duas décadas. Sua relação com o prognóstico foi inicialmente evidenciada em neoplasias de mama. Desde então, estudos têm demonstrado sua associação com pior prognóstico em vários tipos de tumores, incluindo os do sistema nervoso central, do endométrio e ovário, colorretal e gástrico, hepático e pulmonar. Porém, diferentes metodologias empregadas tanto na realização dos estudos quanto na forma de quantificação têm gerado, muitas vezes, resultados conflitantes, o que impossibilita conclusões mais precisas quanto ao seu real valor prognóstico¹⁵³.

Com exceção aos trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, não há na literatura estudos que relacionem CD-34 e prognóstico em tumores neuroendócrinos de pulmão, o que permanece um campo de estudo em aberto.

3. Objetivos

3.1 Objetivo primário

Verificar se há relação entre a quantificação imuno-histoquímica do D2-40, do Ki-67 e do CD-34 e metástase linfática e/ou hematogênica em tumores carcinoides broncopulmonares típicos.

3.2 Objetivo secundário

Estabelecer a relação entre variáveis clínicas e metástase linfática e/ou hematogênica em tumores carcinoides broncopulmonares típicos.

3. Casuística e Métodos

4.1 Parecer ético

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP, em sessão de 17/10/03, sob o número 0572/10. Este trabalho obteve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2010/51335-4 (ANEXO A).

4.2 Desenho do estudo

Foi realizado estudo de coorte retrospectiva no qual foram incluídos pacientes submetidos à cirurgia para tratamento de tumor carcinoide típico broncopulmonar nos Serviços de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da FMUSP e “*Hôpital Européen Georges Pompidou*” da Universidade de Paris V, na França, operados entre 1981 e 2003.

Os blocos de parafina contendo os tumores primários e linfonodos ressecados desses pacientes foram recuperados para análise imuno-histoquímica.

4.3 Critérios de inclusão

- a) Confirmação do diagnóstico histológico de tumor carcinoide típico broncopulmonar do tumor primário feita por dois patologistas de reconhecida experiência na área.
- b) Disponibilidade de dados nos prontuários e exame de tomografia computadorizada de tórax ao final do período de seguimento.
- c) Período de acompanhamento pós-operatório de cinco anos completos.

4.4 Critérios de exclusão

- a) Portadores das síndromes de neoplasias endócrinas múltiplas, para evitar fator de confusão com metástase.
- b) Casos cujo bloco de parafina não se encontravam adequados à realização da imuno-histoquímica.
- c) Pacientes que tinham menos de cinco anos de seguimento.

4.5 Descrição da casuística

Foram estudados 128 pacientes, quatro deles excluídos da análise estatística, pois o material histológico em bloco de parafina foi considerado inadequado para a análise imuno-histoquímica, e 27 excluídos por não ter sido possível o término do acompanhamento determinado em cinco anos.

No estudo final foi avaliado o total de 97 pacientes.

4.5.1 Demografia

Houve predomínio de pacientes franceses (74/97), que representavam 76,3% da casuística em relação aos brasileiros (23/97), cuja representatividade foi de 23,7%, numa proporção aproximada de 3:1.

4.5.2 Gênero

A distribuição quanto ao gênero foi de 56,7% para feminino (55/97) e 43,3% para masculino (42/97).

4.5.3 Idade

Para a análise dessa variável foi excluído um paciente cuja idade não foi possível recuperar de forma fidedigna, sendo avaliados 96 indivíduos.

A idade média foi de 46,2 anos (mínima de 17 anos e máxima de 77), com desvio-padrão de 16,5 anos e mediana de 44 anos.

4.5.4 Cirurgia realizada

A cirurgia realizada com mais frequência foi a lobectomia (59/97).

A descrição das cirurgias realizadas e das respectivas frequências e porcentagens encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Cirurgias realizadas: frequência e porcentagem

Operação	número	%
Lobectomia	59	60,8
Bilobectomia	12	12,4
Segmentectomia	11	11,3
Pneumonectomia	09	9,3
Broncoplastia	05	5,1
Nodulectomia	01	1,03

4.5.5 Localização tumoral em relação à carina principal

Os tumores eram centrais em relação à carina na maioria dos casos 74,2% (72/97) e periféricos, ou seja, distais aos brônquios segmentares em 25,8% (25/97).

4.5.6 Margem cirúrgica comprometida

A margem cirúrgica estava livre da doença em 95,9% dos casos (93/97) e comprometida em 4,1% (4/97).

4.5.7 Estádio patológico

O estadiamento apresentado foi baseado na 7ª edição da Classificação dos Tumores Malignos (TNM) da *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*¹⁵⁴ para tumores pulmonares e corresponde ao estágio no momento da cirurgia (pTNM).

Os estádios iniciais I-a (38/97) e I-b (31/97) foram os mais frequentes, seguidos pelo II-a (13/97), III-a (11/97), II-b (3/97) e IV(1/97).

Tabela 2 - Estadiamento dos casos: 7ª edição TNM

pTNM	número	%
I-a	38	39,2
I-b	31	32,0
II-a	13	13,4
II-b	3	3,1
III-a	11	11,3
III-b	0	0
IV	1	1,0

4.5.8 Tamanho do tumor

O tamanho do tumor foi avaliado pelo seu maior diâmetro mensurado na peça anatômica.

O menor diâmetro foi de 6,0 mm e o maior de 70 mm, com mediana de 20,0.

4.5.9 Metástase linfonodal locorregional

O paciente era considerado livre de metástase linfonodal quando não havia comprometimento metastático nos linfonodos mediastinais e hilares ressecados no ato operatório e não se observava linfonodo maior que 1 cm em tomografia de tórax após o final do tempo de seguimento de cinco anos.

Todos os pacientes foram submetidos a estudo tomográfico do tórax ao final do tempo de seguimento de cinco anos.

A maioria dos casos, 83,4% (81/97), não apresentava metástase linfonodal no momento da cirurgia.

No total, 16,6% dos pacientes (16/97) apresentavam metástase linfonodal no momento da cirurgia.

A metástase em linfonodos peribrônquicos, hilares e intrapulmonares ipsilaterais (N1) estava presente em 8,3% dos casos (8/97) e nos linfonodos mediastinais ipsilaterais ou subcarinais (N2) em 8,3% (8/97).

Um caso, classificado com N0 operatório, teve acometimento em linfonodo mediastinal (N2) durante o seguimento.

Em dois pacientes não houve ressecção de algum linfonodo durante o ato operatório. Ambos foram considerados N0 (sem metástase linfonodal),

pelos motivos: um deles evoluiu para óbito no terceiro mês, sendo submetido à necropsia e a busca ativa de metástase não evidenciou acometimento linfonodal; e outro não apresentou linfonodo maior que 1 cm à tomografia de tórax após o tempo de seguimento, que neste caso especificamente foi superior a 10 anos.

4.5.10 Total de linfonodos dissecados no ato operatório

O número de linfonodos retirados no ato operatório variou de zero a 20, sendo a mediana de 4,0.

4.5.11 Metástase à distância

Em todos esses casos considerados portadores de metástase havia a comprovação histológica de tecido de tumor carcinoide típico em localização que não a da lesão primária.

O paciente foi considerado livre de metástase à distância quando não apresentou imagem sugestiva do acometimento em pulmão, fígado e suprarenal em tomografia de tórax e abdome superior nem os seguintes sinais ou sintomas suspeitos: cefaleia, alterações neurológicas, dor retro-ocular, dor óssea e nódulos cutâneos ou subcutâneos durante o período de seguimento.

Todos os pacientes inclusos no estudo tinham tomografia de tórax e abdome superior ao final do tempo de seguimento.

Apenas um paciente apresentava metástase à distância (hepática) no momento do diagnóstico. Nos outros pacientes, o diagnóstico de metástase à distância, quando presente, foi feito durante o seguimento pós-operatório.

Na casuística total, ao final do seguimento, havia oito casos (8/97) de metástase à distância, que correspondia a 8,2% dos pacientes.

4.5.12 Sobrevivência e óbito

Ao final do tempo de seguimento, 83,5% (81/97) dos pacientes estavam vivos e 15,3% (16/97) haviam evoluído para óbito, sendo quatro desses óbitos (4/16) relacionados à metástase do tumor carcinoide.

A metástase nesses quatro casos comprometia o fígado e em um deles também ossos e mediastino.

4.6 Método

4.6.1 Coleta de dados

A coleta de dados foi feita a partir da análise dos prontuários. Foi estabelecido um banco de dados com informações sobre cada paciente com dados epidemiológicos, clínicos relacionados à doença, cirúrgicos e anatomopatológicos.

Os dados recuperados dos prontuários foram: país de origem, gênero, idade, tipo de cirurgia, localização do tumor em relação à carina principal, margem cirúrgica comprometida, estágio do tumor, metástase linfonodal locorregional, total de linfonodos ressecados, metástase à distância, sobrevivência e óbito.

Os valores das quantificações imuno-histoquímicas foram incluídos posteriormente neste banco de dados para a realização da análise estatística.

4.6.2 Confirmação do diagnóstico histológico

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

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

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

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

A classificação do tipo de tumor neuroendócrino foi realizada nas áreas mais representativas, identificadas após análise de pelo menos 10 campos microscópicos com ampliação de 250x. Já a classificação histológica obedeceu aos critérios preconizados pela OMS baseado no padrão predominante identificado, segundo os critérios de Travis *et al.* já anteriormente descritos.

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

Após essa seleção as lâminas obtidas a partir dos blocos referentes aos pacientes recrutados foram preparadas para a marcação imuno-histoquímica D2-40, Ki-67 e CD-34.

4.6.3 Técnicas de coloração

4.6.3.1 Técnica imuno-histoquímica empregada na detecção de D2-40, Ki-67 e CD-34

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

Antes da realização das reações imuno-histoquímicas, as lâminas foram submetidas ao seguinte processo de silanização: primeiramente foram mergulhadas em uma cuba com álcool, em duas cubas consecutivas com acetona e depois em mais duas consecutivas com silane (SIGMA A3648) por cinco minutos em cada uma. O procedimento termina com mais quatro banhos, sendo dois em duas cubas com acetona e, em seguida, em duas com água destilada.

As lâminas silanizadas foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica. Primeiramente, foram desparafinizadas (permaneceram 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de três banhos de xilol à

temperatura ambiente). Em seguida, o tecido foi hidratado por submersão em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente, lavado em água corrente e depois em água destilada e deionizada. O próximo passo foi a recuperação antigênica realizada a vapor na qual foram colocadas as lâminas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 a 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 três minutos. Na sequência procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena feito pela lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%), sete vezes por cinco minutos, seguido de lavagem em água corrente, em água destilada e em PBS, respectivamente, três vezes por três 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. As lâminas foram, então, escorridas e secadas ao redor do corte.

Os anticorpos primários foram adicionados, cada um em uma lâmina pré-processada, na seguinte diluição: podoplanina- D2-40 (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) título 1:500 e Ki-67 (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) título 1:600 e CD34 (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) título 1:100. As diluições foram feitas em soro albumina bovina (BSA 0,5%). 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 três minutos e a seguir 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 seguiu a seguinte sequência de utilização: primeiramente, incubou-se o anticorpo secundário por 1 hora a 37°C e lavaram-se as lâminas em tampão PBS que a seguir foram incubadas pela estreptoavidina-biotinilada peroxidase por 45 minutos a 37°C.

Após três banhos de três minutos em PBS, procedeu-se à revelação, 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 cinco minutos, lavadas em água corrente por mais cinco minutos, contracoradas em hematoxilina de Harris (*Sigma Diagnostics*, St. Louis, USA) por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente por cinco minutos para serem desidratadas em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto e em solução de xilol três vezes, respectivamente. As lâminas foram finalmente montadas com lamínula e Entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

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

4.6.3.2 Determinação dos índices imuno-histoquímicos

A coloração castanha foi considerada evidência da expressão do anticorpo D2-40 nas células endoteliais de vasos linfáticos.

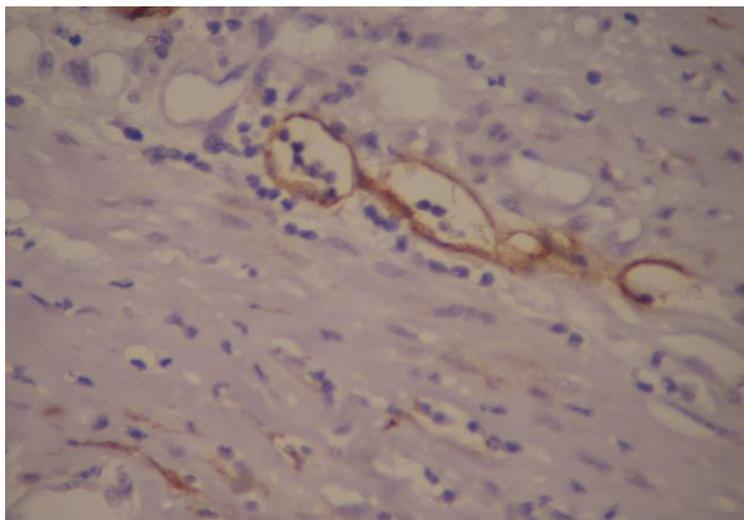


Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica anticorpo D2-40 em aumento de 400X.

FONTE: elaborado pela autora.

A coloração castanha nuclear foi considerada evidência da expressão do anticorpo Ki-67 nas células neoplásicas.

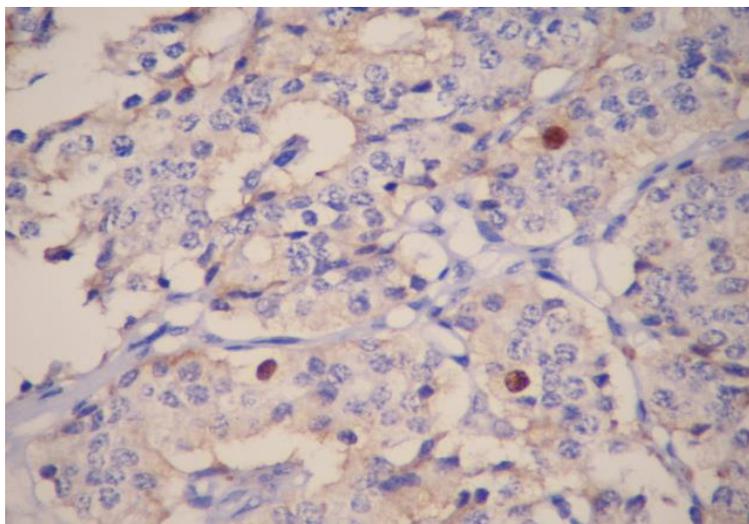


Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica anticorpo Ki-67 em aumento de 400X

FONTE: elaborado pela autora.

A coloração castanha foi considerada evidência da expressão do anticorpo CD-34 nas células endoteliais dos microvasos.

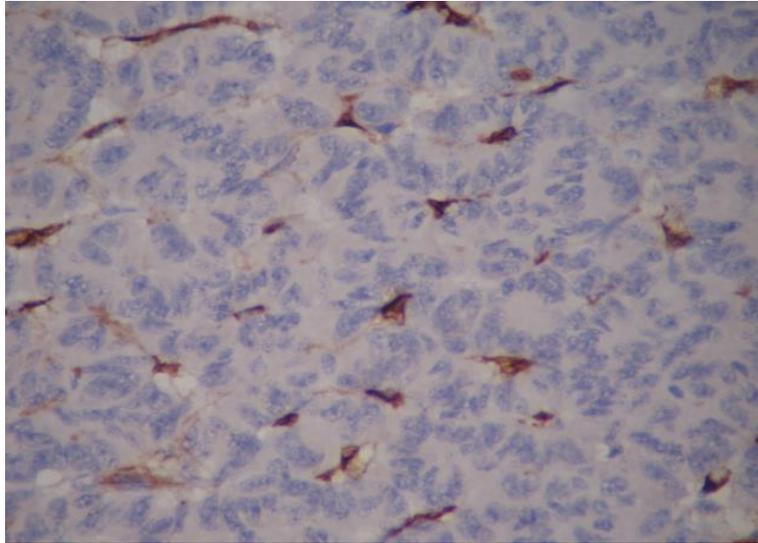


Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina corada por imuno-histoquímica anticorpo CD-34 em aumento de 400X

FONTE: elaborado pela autora.

Para determinar os índices de expressão dos antígenos depois da imuno-histoquímica, foi usada a técnica do *point-counting*, utilizando retículo contendo 100 pontos e 50 retas, segundo proposto em 1988 por Gundersen *et al.* Ao aumento de 400X, foram examinados 10 campos microscópicos aleatórios e não coincidentes dentro na periferia tumoral para o anticorpo D2-40, e na área tumoral para os anticorpos CD-34 e KI-67 totalizando 1.000 pontos por lâmina, cobrindo área de 62.500 mm² em cada caso.

Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos do total de pontos em áreas sólidas, segundo a formula:

$$P_{\text{PONTOS}} = (P_i \times 100) / P_{\text{PARÊNQUIMA}}$$

sendo P_{PONTOS} a porcentagem corrigida de pontos marcados, P_i o número de pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico e $P_{\text{PARÊNQUIMA}}$ o total de pontos que incidem sobre a área sólida tumoral.

A P_{PONTOS} de cada antígeno em cada caso foi calculada a partir da soma dos resultados P_i e $P_{\text{PARÊNQUIMA}}$ de todos os campos analisados para cada paciente. Todas as contagens foram feitas por um único examinador. Comparações de contagem de dois observadores foram feitas em cerca de 20% dos casos.

4.7 Análise estatística

As medidas de tendência central e dispersão dos valores das amostras, assim como dos testes estatísticos para comparação entre elas, basearam-se nos tipos de distribuição verificada a partir do teste de Anderson-Darling.

Como a distribuição de todas as variáveis quantitativas apresentou distribuição não gaussiana em pelo menos uma das categorias, a comparação das variáveis quantitativas com as variáveis categóricas foi feita empregando-se o teste de Mann-Whitney.

As variáveis quantitativas foram descritas por meio da mediana, amplitude e quartis.

Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis qualitativas foram realizadas pela aplicação do teste Exato de Fisher, uma vez que as variáveis apresentaram pelo menos uma das frequências esperadas abaixo de cinco.

Foi calculada a razão de chances (*odds ratio*) 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 e frequências adotou-se o valor de significância estatística $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$).

Para todas as análises foi usado o programa Minitab versão 14.0.

5. Resultados

5.1 Quantificação dos marcadores

5.1.1 Quantificação da podoplanina (D2-40)

A quantificação da marcação imuno-histoquímica da podoplanina foi avaliada a partir da área e da densidade linfática, conforme descrito na metodologia.

Em quatro casos (4,1%) não houve marcação imuno-histoquímica para a podoplanina.

- Área linfática

Os valores obtidos pela quantificação da área dos linfáticos marcados foram: mediana de 0,02, valor mínimo de zero e máximo de 0,14.

- Densidade

Os valores obtidos pela quantidade de linfáticos presentes na superfície do tumor (densidade D2-40) foram: mediana 1,60 com valor mínimo de zero e máximo de 4,5.

5.1.2 Quantificação do KI67

Os valores obtidos pela quantificação da expressão imuno-histoquímica da proteína nuclear KI67 tiveram mediana de zero e valor mínimo foi zero e o máximo de 1,24.

Em quatro casos (4,1%) não houve detecção imuno-histoquímica do KI67.

5.1.3 Quantificação do CD-34

Os valores obtidos pela quantificação do número de microvasos marcados foram: mediana 7,3, valor mínimo de 1,05 e máximo de 24,8.

Em seis casos (6,2%) não houve marcação imuno-histoquímica para o CD-34.

5.2 Análise da casuística

As variáveis demografia, gênero, idade, localização do tumor, tamanho do tumor, margem comprometida, total de linfonodos dissecados, quantificação dos marcadores Ki67, CD34 e podoplanina (área linfática e densidade) foram comparadas a cinco desfechos:

- Metástase linfática;
- metástase em linfonodos hilares, peribrônquicos e pulmonares ipsilaterais (N1);
- metástase em linfonodos mediastinais ipsilaterais (N2);
- metástase hematogênica;
- metástase linfática ou hematogênica.

5.2.1 Variáveis da casuística e metástase linfática

Não houve significância estatística na associação entre as variáveis demografia, idade, localização do tumor, tamanho do tumor, margem comprometida, metástase hematogênica no momento da cirurgia (M1 operatório) e quantificação dos marcadores D2-40, Ki-67, CD34 com metástase linfática.

O gênero masculino apresentou associação marginal com metástase linfática (teste usado: Mann-Witney, $p=0,051$) (TABELA 3).

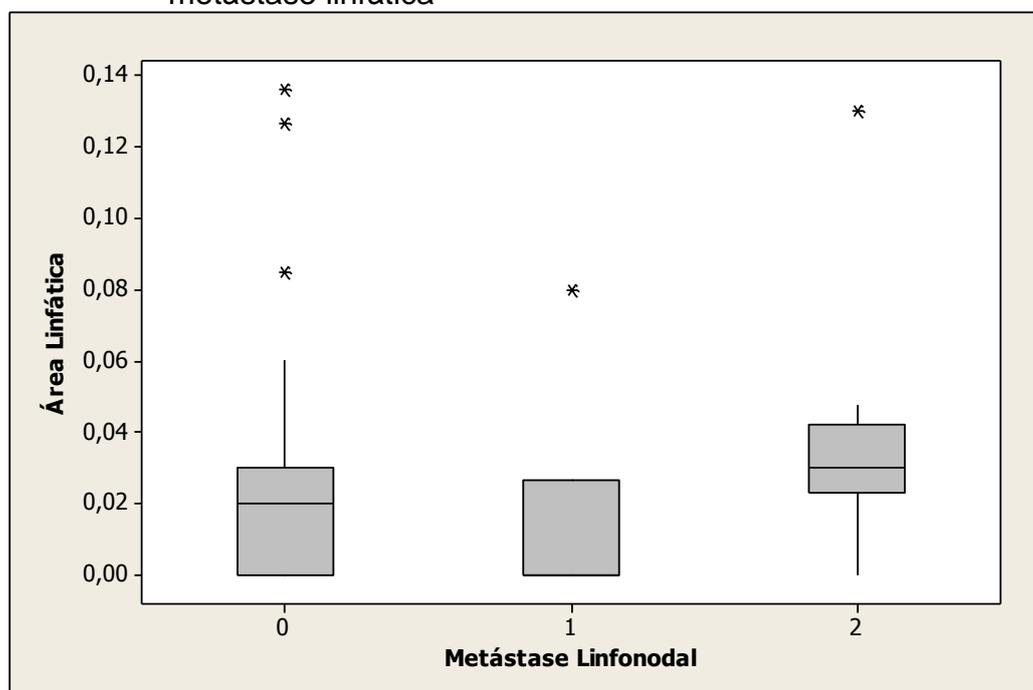
Tabela 3 - Fatores associados à metástase linfática

	Sem metástase		Com metástase		OR	IC 95%	Valor-p
	N	%	N	%			
País							
França	62	77,5	12	70,6	1,44	0,45 a 4,61	0,55
Brasil	18	22,5	5	29,4			
Gênero							
Masculino	31	38,7	11	64,7	0,35	0,12 a 1,03	0,051
Feminino	49	61,3	6	35,3			
Localização							
Central	62	77,5	10	58,8	2,41	0,80 a 7,24	0,124
Periférico	18	22,5	7	41,2			
M:Op							
0	79	98,8	17	100,0	0,53
1	1	1,2	0	0,0			
M:final							
0	75	93,8	14	82,4			
1	5	6,2	3	17,6	3,21	0,69 a 15,01	0,158

Teste Exato de Fisher.

A comparação entre área linfática marcada pela podoplanina com metástase linfática em linfonodos mediastinais (N2) apresentou valor $p=0,08$. Foi a associação que mais se aproximou do valor de significância nesta amostra (teste usado: Mann-Whitney).

Gráfico 1 – Comparação dos valores de marcação da área linfática pela podoplanina entre os grupos segundo a ocorrência de metástase linfática



Legenda: 0 - Sem metástase linfonodal. 1 - Metástase em linfonodos hilares, peribrônquicos e pulmonares ipsilaterais. 2- Metástase em linfonodos mediastinais ipsilaterais.

Tabela 4 - Fatores associados à metástase linfática (comparação entre sítios de metástase)

	N0		N1		N2		Valor-p
	N	Mediana	N	Mediana	N	Mediana	
Idade	79	43	8	45,5	9	52,0	0,36
Maior diâmetro	80	20,0	8	22,5	9	35,0	0,29
CD 34	77	7,61	6	5,8	8	5,9	0,26
Densidade D2-40	77	1,50	7	0,0	9	1,67	0,32
Área linfática D2-40	77	0,02	7	0,0	9	0,03	0,08
Ki-67	77	0,0	8	0,0	8	0,0	0,91
							0,12
Maior diâmetro	80	20,0	8	22,5	9	35	0,41

Teste usado – Mann-Whitney.

5.2.2 Variáveis da casuística e metástase hematogênica

Não houve significância estatística na associação entre as variáveis demografia, gênero, idade, localização do tumor, tamanho do tumor, metástase linfática no momento da cirurgia (N operatório) e quantificação dos marcadores D2-40, Ki-67 e CD34 e a metástase hematogênica.

A margem comprometida (doença residual) teve significância estatística na associação com metástase hematogênica (teste usado: Mann-Witney, $p=0,03$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Fatores associados à metástase hematogênica

		Sem metástase		Com metástase		OR	IC 95%	Valor-p
		n	%	N	%			
País	França	69	77,5	5	62,5	2,07	0,45 a 9,42	0,39
	Brasil	20	22,5	3	37,5			
Sexo	Masculino	38	42,7	4	50,0	0,75	0,18 a 3,17	0,72
	Feminino	51	57,3	4	50,0			
Margem comprometida								
	Não	87	97,8	6	75,0	14,5	1,7 a 121,7	0,03
	Sim	2	2,2	2	25,0			
Localização tumor								
	central	66	74,2	6	75,0	0,96	0,12 a 5,85	1,0
	Periférico	23	25,8	2	25,0			
N:final	0	75	84,3	5	62,5	3,21	0,69 a 15,01	0,14
	1	14	15,7	3	37,5			
N:final	0	75	84,3	6	75,0	1,79	0,33 a 9,77	0,61
	1	14	15,7	2	25,0			

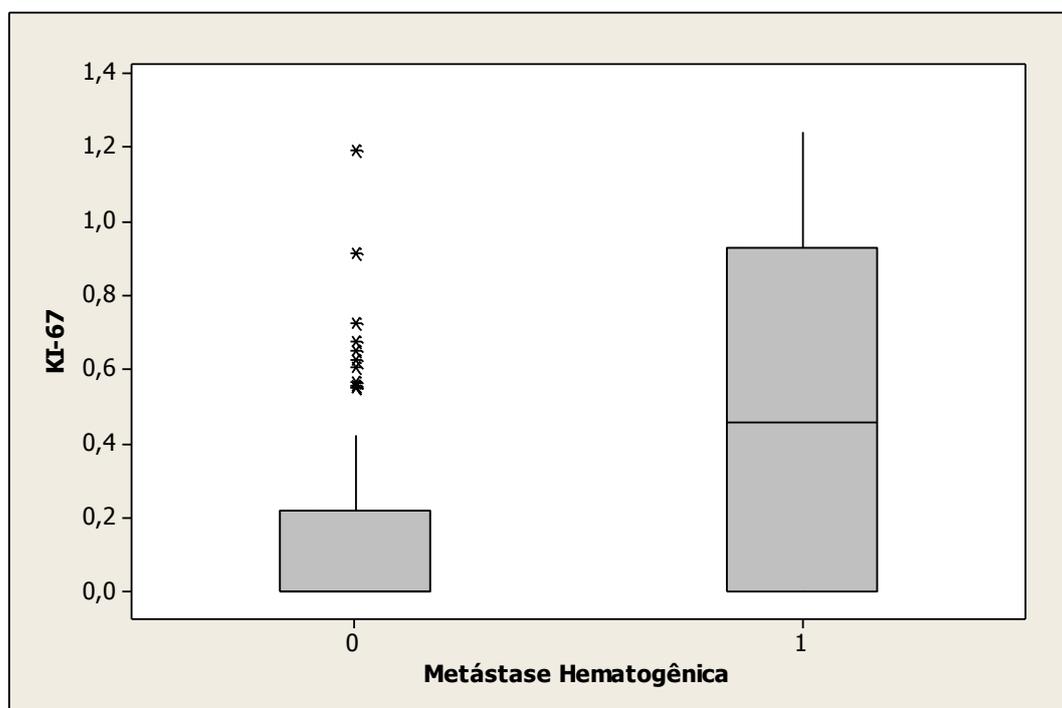
Teste usado Exato de Fisher.

A comparação da marcação do Ki-67 com metástase hematogênica apresentou valor $p=0,08$ nesta amostra. Foi a associação que mais se aproximou do valor de significância (teste usado: Mann-Whitney).

Tabela 6 - Fatores associados à metástase hematogênica

	Não		Sim		Valor-p
	N	Mediana	N	Mediana	
Idade	88	43	8	48	0,35
Maior diâmetro	89	25,0	8	20	0,62
CD 34	84	7,48	7	6,3	0,78
Densidade D240	86	1,6	7	1,6	0,93
Área linfática D2-40	86	0,021	7	0,02	0,95
Ki- 67	86	0,0	7	0,46	0,08
Maior diâmetro	89	25,0	8	20,0	0,62

Teste usado: Mann-Whitney.

Gráfico 2 – Comparação dos valores de marcação do KI67 entre os grupos segundo a ocorrência de metástase hematogênica

Legenda: 0 – Sem metástase hematogênica; 1- Metástase hematogênica.

5.2.3 Variáveis da casuística e metástase hematogênica ou linfática

Não houve significância estatística na associação entre as variáveis demografia, gênero, idade, localização do tumor em relação à carina principal, tamanho do tumor, metástase linfática no momento da cirurgia (N operatório) e quantificação dos marcadores Ki-67, podoplanina (área linfática e densidade) e CD34 com metástase hematogênica ou linfática.

A comparação entre localização do tumor e metástase hematogênica ou linfática, apresentou valor $p=0,09$. Foi a associação que mais se aproximou do valor de significância (teste usado: Exato de Fisher).

Tabela 7 - Fatores associados à metástase linfática ou hematogênica

	Sem metástase		Com metástase		OR	IC 95%	Valor-p
	n	%	N	%			
País							
França	59	78,7	15	68,2	1,72	0,60 a 4,94	0,39
Brasil	16	21,3	7	31,8			
Sexo							
Masculino	30	40,0	12	54,6	0,56	0,21 a 1,45	0,33
Feminino	45	60,0	10	45,4			
Localização tumor							
Central	59	78,7	13	59,0	2,55	0,93 a 7,04	0,09
Periférico	16	21,3	9	41,0			
N:final							
0							
1							
Operação							
Nodulectomia	1	1,35	0	0,0	0,58		0,58
Segmentectomia	10	13,51	1	4,55			
Lobectomia	44	59,46	14	63,64			
Bilobectomia	10	13,51	02	9,09			
Pneumonectomia	5	6,76	4	18,18			
Broncoplastia	4	5,41	1	4,55			
Estágio operatório							0,57
I-a	35	46,7	3	13,6			
I-b	30	40,0	1	4,6			
II-a	6	8,0	7	31,8			
II-b	3	4,0	0	0,0			
III-a	1	1,3	10	45,5			
IV	0	0,0	1	4,6			

Teste usado: Exato de Fisher.

Tabela 8 - Fatores associados à metástase linfática ou hematogênica

	Não		Sim		Valor-p
	N	Mediana	N	Mediana	
Idade	74	42,5	22,0	47,5	0,29
Maior diâmetro	75	20,0	22	27,5	0,32
CD 34	72	7,7	19,0	6,3	0,33
Densidade D240	72	1,5	21	1,7	0,37
Área linfática D2-40	72	0,020	21	0,027	0,53
Ki- 67	72	0,0	21	0,0	0,94
Maior diâmetro	75	20,0	22,0	27,5	0,32

Teste usado: Mann-Whitney.

6. Discussão

6.1 Abordagem crítica das limitações do estudo

6.1.1 Desenho epidemiológico

Este é um estudo retrospectivo.

O tumor carcinoide típico broncopulmonar é doença pouco frequente em que o evento metástase é raro.

Do ponto de vista teórico, o ideal para se pesquisar a associação entre a doença e o evento estudado seria uma pesquisa prospectiva, porém, nesse caso, no qual doença e eventos são raros, seria necessário elevado número de pacientes, com longo e dispendioso tempo de acompanhamento. Portanto, justifica-se a escolha do desenho de estudo retrospectivo, inclusive na tentativa de delinear a melhor forma de estruturação de um futuro estudo prospectivo.

6.1.2 Coleta de dados

Na tentativa de uniformizar a obtenção de dados, foi estabelecida uma ficha padrão para coleta dos mesmos.

Foram selecionados para o estudo dados objetivos constantes nos prontuários.

Os dados nos quais algum viés era identificado não foram estudados. Como exemplos, podem-se citar o tabagismo e emagrecimento.

6.1.3 Uniformidade do tratamento

A casuística é composta de pacientes cujo tratamento cirúrgico não foi realizado de forma homogênea.

Na literatura, não há consenso sobre a melhor ressecção pulmonar a ser realizada como tratamento dos tumores carcinoides típicos broncopulmonares¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Parece haver tendência à realização de técnicas de ressecção que possibilitem melhor preservação pulmonar, porém essa conduta não é considerada uma regra^{54,117,118}. O impacto do tipo de ressecção na evolução natural dessa doença não é bem definido.

Embora a casuística seja composta de pacientes que foram submetidos a ressecções pulmonares distintas, tal fato foi estudado e relacionado ao evento metástase.

A extensão e o tipo da dissecação linfonodal para tratamento e estadiamento também são alvos de controvérsia.

Não há evidências da linfadenectomia mediastinal estendida para estadiamento e tratamento dos tumores carcinoides típicos broncopulmonares^{57,117}.

A não padronização do tipo e da extensão da dissecação linfonodal nessa casuística poderia gerar um possível viés de classificação no grupo sem metástase linfonodal. A fim de minimizar esse viés, todos os pacientes foram acompanhados por cinco anos e só eram alocados no grupo sem metástase linfonodal se não apresentassem linfadenomegalia maior que 1 cm na tomografia de tórax realizada ao final do tempo de seguimento.

Embora esse critério tenha sido considerado aceitável em nossa linha de pesquisa, sabe-se que linfonodos menores que 1 cm podem apresentar metástases ou mesmo micrometástases.

Porém, estudo realizado por Daniel Messias Moraes Neto em nosso meio mostrou que nenhum dos pacientes operados por tumor carcinoide típico broncopulmonar com diagnóstico de micrometástase evoluiu com macrometástase num período de acompanhamento de cinco anos, sendo que 33,3% deles foram acompanhados por mais de 10 anos, concluindo-se que esses eventos são, aparentemente, independentes¹⁵⁵.

6.2 Abordagem crítica dos resultados

6.2.1 Variáveis clínicas

A literatura tem mostrado que a etnia pode ser um fator relacionado à incidência e ao desfecho em alguns tipos de câncer¹⁵⁶.

Nesta casuística havia mais pacientes franceses (proporção aproximada 3:1).

A possibilidade de se tratar de grupos distintos quanto às características avaliadas e suas associações com os eventos pesquisados não mostrou diferença significativa nesta amostra.

A proporção similar entre os gêneros, a predominância da localização central entre os tumores e a frequência de estágios operatórios mais iniciais apresentou-se conforme descrito na literatura⁵⁴.

A média de idade encontrada foi um pouco acima da descrita para pacientes portadores de tumores carcinoides típicos⁵⁴. O fato de tratar-se de tumor de crescimento lento e parte dos indivíduos ser assintomática poderia justificar um diagnóstico em tempos distintos da evolução da doença, o que talvez possa explicar o achado neste estudo.

Os tumores carcinoides típicos broncopulmonares podem gerar metástases por via linfática em quase 15% dos casos e por via hematogênica em torno de 5%, índice próximo do evidenciado nesta pesquisa, que foram, respectivamente, 16,6 e 7,2%.

A sobrevida em cinco anos de 83,5% também é próxima da relatada na literatura, que fica em torno de 90%⁵⁶.

6.2.2 Variáveis clínicas e metástases

O gênero masculino apresentou associação marginal com metástase linfática.

Estudos prévios em nosso grupo de pesquisa já haviam evidenciado a relação entre o gênero masculino e metástase à distância^{5,9}.

A despeito desse achados, essa associação ainda deve ser mais bem estudada.

A margem comprometida mostrou associação com metástase hematogênica corroborando achados anteriores em nossa linha de pesquisa^{5,6}.

Nenhum dos pacientes com margem cirúrgica comprometida teve recidiva tumoral na linha de anastomose ou coto brônquico.

Ainda permanece indefinida a melhor conduta nesses casos, havendo tendência a não reoperar pacientes com tumor presente apenas microscopicamente na margem cirúrgica, sem evidências macroscópicas ou radiológicas de recidiva^{117,157}.

A associação entre margem comprometida e metástase linfática não foi medida, pois as metástases linfonodais, à exceção de um caso, foram diagnosticadas com base em linfonodos retirados no ato operatório.

Quando em localização periférica, sabe-se que os tumores são mais frequentemente atípicos e, portanto, mais agressivos⁵⁷.

A associação entre a localização periférica e metástases nos tumores carcinoides broncopulmonares típicos tem sido demonstrada por estudos prévios da linha de pesquisa^{6,10}.

Fernando Moura Silva, em casuística de 62 casos de pacientes franceses operados por tumor carcinóide típico broncopulmonar, enfatizou associação entre localização periférica e metástase linfática¹⁰.

Ao estudar 182 pacientes, entre brasileiros e franceses também operados por tumor carcinóide típico broncopulmonar, Mariana Laloni realçou associação entre a localização periférica e metástase hematogênica⁶.

Embora a comparação entre a localização do tumor e metástase hematogênica ou linfática não tenha apresentado significância estatística neste trabalho, chama a atenção o fato de o valor encontrado ter se aproximado do valor de significância.

6.2.3 Marcadores e metástases

6.2.3.1 Podoplanina (D2-40)

Apesar dos esforços do grupo de Pesquisa em Tumores Carcinoides da Faculdade de Medicina da USP, questões importantes como o real papel da linfangiogênese no desenvolvimento das metástases em tumores carcinoides típicos broncopulmonares ainda continuam sendo um desafio.

Deve ser dispensada atenção ao fato de a associação entre a área linfática marcada pelo D2-40 e metástase em linfonodos mediastinais (N2) nos

tumores carcinoides típicos broncopulmonares ter sido a que mais se aproximou dos valores de significância, podendo ser esta a chave para que futuros estudos possibilitem melhor entendimento deste fenômeno.

As células tumorais precisam aderir a uma molécula da membrana celular endotelial do vaso para que ocorra a invasão do mesmo¹⁰¹.

Tal fenômeno poderia explicar uma possível associação entre área linfática e metástase em linfonodos mediastinais, pois quanto maior a área do vaso, maior a possibilidade de adesão das células tumorais.

6.2.3.2 Catepsina D-34 (CD-34) e Ki-67

A quantificação da angiogênese a partir do CD-34 bem como a quantificação da proliferação celular a partir do Ki-67 mostraram-se preditivas de metástases em estudos prévios realizados nessa linha de pesquisa.

Na coorte de 55 casos de pacientes brasileiros operados por tumores carcinoides típicos e avaliados em 2004 por João Carlos das Neves Pereira, a dosagem imuno-histoquímica de CD-34 foi variável independente preditiva de metástase linfonodal e de metástase linfonodal ou à distância, mas não informou correlação com metástase à distância⁵.

Em 2008, o mesmo autor realizou estudo muito semelhante, porém em coorte maior e multicêntrica de 330 casos brasileiros e franceses. Foram observadas a quantificação imuno-histoquímica de CD-34 e do Ki-67 como preditivas de metástase linfática.

Em ambos os estudos, o índice imuno-histoquímico era determinado, em cada lâmina, pela avaliação de 10 campos de maior densidade vascular⁹.

Na atual casuística, não foi verificada associação entre o CD-34 e o Ki-67 e metástase, porém o critério usado para determinação do índice imunohistoquímico considerou, em cada lâmina, campos aleatórios, e não os campos de mais densidade vascular; o que poderia justificar o conflito de resultados.

Portanto, mais pesquisas precisam ser realizadas para melhor entendimento dessa associação.

6.3 Considerações finais

Este trabalho ressalta a importância do estudo dos tumores da grade neuroendócrina de forma independente para que se possa obter resultados realmente esclarecedores quanto ao real valor prognóstico dos marcadores tumorais. Não é mais aceitável que entidades sabidamente distintas sejam avaliadas em conjunto.

Além disso, destaca a importância de esforços futuros na padronização da metodologia da quantificação dos marcadores, que possibilitará uma avaliação em conjunto dos vários estudos a fim de definir a possível implicabilidade clínica dos mesmos.

Somente a persistência obstinada no estudo dos tumores neuroendócrinos de forma individualizada e padronizada poderá futuramente definir qual o real valor prognóstico dos imunomarcadores.

7. Conclusões

- a) Não foi detectada associação entre a quantificação dos marcadores D2-40, Ki-67 e CD-34 e ocorrência de metástase nesta casuística.

- b) Detectaram-se, entre as variáveis clínicas estudadas: associação entre margem comprometida e metástase hematogênica; e associação marginal entre gênero masculino e metástase linfática.

8. Referências

1. Siegel R, Naishadham MA, Jemal DVM. Cancer Statistics, 2013. *Ca Cancer J Clin* .2013;63:11-30
2. Rocco G. The surgeon's role in molecular biology. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012; 144:18-22.
3. Moran CA, Suster S, Coppola D, Wick MR. Neuroendocrine carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol*. 2009; 131:206-221.
4. Das Neves Pereira JC, da Silva AG, Soares F, Ab'Saber AM, Schmidt A, Rodrigues OR, et al. Nuclear and environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. *Pathol Res Pract*. 2004; 200(6):459-67.
5. Pereira, JCN. Estudo da correlação entre a incidência de metástases em tumores carcinoides típicos broncopulmonares e biomarcadores teciduais, variáveis clínicas e índice de risco. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
6. Laloní, MT. Predição do risco individual de metástase linfática e hematogênica em função da intensidade de linfangiogênese no tumor carcinóide típico broncopulmonar [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
7. Trufelli D, Matos I, Pereira J, Santos A, Sander J, Capelozzi V, et al. Bcl2 family proteins and lymph node metastasis in broncopulmonary carcinoid tumors. *Eur J Câncer Supl*. 2005. 3(2):341.
8. Pereira JCN, Matos LL, Daniel C, Trufelli D, Riquet M. Typical Broncopulmonary carcinoid tumors: a ramifying bronchial presentation with metastatic behavior. *Ann Thorac Surg*. 2006; 82:265-6.
9. Das Neves Pereira JC, Bagan P, Milanez-de-Campos JR, Capelozzi VL, Danel C, Jatene FB, et al. Individual risk of nodal metastasis for patients with typical bronchial carcinoid tumors. *Eur J Cardiothoracic Surg*. 2008; (3); 473-7.
10. Silva FM. Expressão de receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2) em carcinoides broncopulmonares típicos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
11. Day AAR. Nível de expressão tumoral da indoleamine 2,3-dioxigenase como marcador biológico e preditor de metástase em pacientes com tumor carcinóide típico broncopulmonar. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
12. Villar EM, Scholl FG, Armat CG, Ávila MQ. PA2.26 antigen (T1-alfa/podoplanin): a small mucin-like transmembrane glycoprotein

- associated with cell migration and cancer. *Rev Oncol.* 2003; 5(9):491-9.
13. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol.* 1984; 133:1710-8.
 14. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentis M, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(12):881-6.
 15. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica: texto e atlas*, Guanabara Koogan, 2005.
 16. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky RS, Larsen PR. *Willians Textbook of Endocrinology.* 2007; 11:1821-40.
 17. Yung B, Lowe JS, Stevens A, Eath JW. *Wheter's funcional histology*, 5 ed., Churchill Livingstone, 2006.
 18. Kloppel G. Tumor biology and histopathology of neuroendocrine tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol.* 2007; 21;15-31.
 19. Wilander E, Grimelius L. Identification, characterization and classification of endocrine tumors. *Zentral Fur Phathol.* 1993; 139:95-100.
 20. Solcia RG, Kloppel G, Solbin LH. *Histological typing of neuroendocrine tumors.* 2. ed., 2000. Springer, Berlim.
 21. Wang JC, Shi DR, Fu XL, Lu WP, Shi FJ, Lu CL. Analysis of clinicopathologic features and morphogenesis of carcinoid tumorlets in the lung with bronchiectasis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2003; 32(4):350-3.
 22. Gould VE, Linnoilla RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine components of bronchopulmonary tract: hiperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest.* 1983; 49(5):519-37.
 23. Reznik-Schüller H. Proliferation of endocrine (APUD-type) cells during early N-diethylnitrosamine-induced lung carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.* 1976; 1:255-59.
 24. Reznik-Schüller H. Ultrastructural alterations of APUD cells during nitrosamine-induced lung carcinogenesis. *J Pathol.* 1977; 121:79-83.

25. Aubry M-C, Thomas CF Jr, Jett JR, Swensen SJ, Myers JL. Significance of multiple carcinoid tumors and tumorlets in surgical lung specimens: analysis of 28 patients. *Chest*. 2007; 131(6):1635-1643.
26. Chugtai T, Morin J, Sheiner N, Wilson JA, Mulder DS. Bronchial carcinoid—twenty years' experience defines a selective surgical approach. *Surgery*. 1997; 122:801-808.
27. Daddi N, Ferolla P, Urbani M, Semeraro A, Avenia N, Ribacchi R et al. Surgical treatment of neuroendocrine tumors of the lung. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004; 26(4):813-17.
28. Soga J, Yakuwa Y. Bronchopulmonary carcinoids: an analysis of 1875 reported cases with special reference to a comparison between typical carcinoids and atypical varieties. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 1999; 5:211-19.
29. Brambilla E, Lantuejoul S, Sturm N. Divergent differentiation in neuroendocrine tumors. *Semin Diagn Pathol*. 2000; 17:138-148.
30. Moran CA, Suster S, Coppola D, Wick MR. Neuroendocrine carcinomas of lung. A critical analysis. *Am J Clin Pathol*. 2009; 131:206-221.
31. Hausmann DH, Weimann R. Pulmonary tumorlet with hilar lymph node metastasis. *Cancer*. 1967; 20:1515-19.
32. Bensch KG, Gordon GB, Miller LR. Electron Microscopic and biochemical studies on the bronchial carcinoid tumor. *Cancer*. 1965; 18:592-602.
33. Hage E. Histochemistry and fine structure of bronchial carcinoid tumors. *Virchows. Arch A Pathol Pathol Anat*. 1973; 361(2):121-8.
34. Queiroz AC. Quimiodectomas microscópicos do pulmão. *Acta Med Port*. 1979; 1:689-95).
35. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization Classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*. 2005; 40(2):90-7.
36. The World Health Organization Histological Typing of Lung Tumors. Geneva, World Health Organization, 1981.
37. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1972; 64(3):413-21.

38. Delmonte Capelozzi V, Alberti O, Saldiva PHN. Large cell carcinoma of the lung: ultrastructural and immunohistochemical features. *Chest*. 1986; 90:524-6.
39. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, Hitchcock CL, Cutler GB, Nieman L, et al. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 15(6):529-533, 1991.
40. Dresler CM, Ritter JH, Patterson A, Ross E, Bailey MS, Wick MR. Clinical-Pathologic analysis of 40 patients with large cell neuroendocrine carcinoma of lung. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63:185.
41. Travis WD, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. The histological typing of lung and pleural tumors, WHO/IASLC classification of lung and pleural tumor. Berlin: Springer Verlag, 1999.
42. Travis WD, Gal AA, Colby TV, Klimstra DS, Falk R, Koss MN. Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. *Hum Pathol*. 1998; 29(3):272-9.
43. Ab'Saber AM. Relevância clínica dos carcinomas de grandes células pulmonares com relação às características neuroendócrinas, biomoleculares e estromais [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.
44. Zacharias J, Nicholson AG, Ladas GP, Goldstraw P. Large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinomas with neuroendocrine morphology of lung; prognosis after complete resection and systematic nodal dissection. *Ann Thorac Surg*. 2003; 75:348-52.
45. Ab' Saber AM, Massoni Neto LM, Bianchi CP, Ctenas BB, Parra ER, Eher EM, et al. Neuroendocrine and biologic features of primary tumors and tissue in pulmonary large cell carcinomas. *Ann Thorac Surg*. 2004; 77(6):1883-90.
46. Przygodzki RM, Finkelstein SD, Langer JC, Swalsky PA, Fishback N, Bakker A, et al. Analysis of p53, K-ras-2, and C-ralf-1 in pulmonary neuroendocrine tumors: correlation with histological subtype and clinical outcome. *Am J Pathol*. 1996; 148:1531-41.
47. Iyoda A, Hiroshima K, Toyozaki T, Haga Y, Fujisawa T, Ohwada H. Clinical characterization of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma and large cell with neuroendocrine morphology. *Cancer*. 2001; 91:1992-2000.
48. Oberndorfer S. Karzinoid tumoren des dünndarms. *Frankf Z Pathol*. 1907; 1:425-28.

49. Gosset A, Masson P. Tumeurs endocrines de l'appendice. *Presse Med.* 1914; 25:237-240.
50. Engelbreth-Holm J. Benign bronchial adenomas. *Acta chir Scand.* 1944; 90:384-09.
51. Soutter L, Sniffen RC, RobinsLL. A clinical survey of adenomas of trachea and bronchus in a general hospital. *J Thorac Surg.* 1954; 28:412.
52. Wilkins EW Jr, Darling RC, Soutter L, Sniffen RC. A continuing clinical survey of adenomas of the trachea and bronchus in a general hospital. *J Cardiothorac Surg,* 1963; 46:279-89.
53. Carter D, Eggleston J. Tumors of lower respiratory tract. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1980.
54. Conley Y, Cafoncelli A, Khan JH, Khan MZ, Aburahma AF, Boland JP. Bronchial carcinoid tumor: experience over 20 years. *Am Surg.* 1992; 58:670-72.
55. Vadasz P, Palffy G, Egervary M, Schaff Z. Diagnosis and treatment of bronchial carcinoid tumors: clinical and pathological review of 120 operated patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993; 7(1):8-11.
56. Shields TW, LoCicero J, Reed CE, Feins RH. *General thoracic surgery.* 7th ed., v. 1, Lippincott Williams & Wilkins 2009; 1539-54.
57. Shields TW, LoCicero III J, Ponn RB. *General Thoracic Surgery.* 5th ed., v. 1, Lippincott Williams & Wilkins 2000; 1493-04.
58. McCaughan BC, Martini N, Bains MS. Bronchial carcinoids. Review of 124 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 1985; 89:8-17.
59. Raut CP, Kulke MH, Glickman JN, Swanson RS, Asheley SW. Carcinoid tumors. *Curr Probl Surg.* 2006; 43:391-450.
60. Soga J, Yakuma Y, Osaka M. Carcinoid syndrome: a statistical evaluation of 748 reported cases. *J Exp Clin Cancer Res.* 1999; 18(2):133-41.
61. Okike N, Bernatz PE, Woolner LB. Carcinoid tumors of the lung. *Ann Thorac Surg.* 1976; 22:270-7.
62. Kvols L. Medical oncology considerations in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Semin Oncol.* 1994; 21(suppl13):56-60.

63. Oberg K, Astrup L, Eriksson B. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (including bronchopulmonary and thimic neoplasms). Part I: general overview. *Acta Oncol.* 2004; 43:617-25.
64. Younes RN, Badra C. Tumores neuroendócrinos (carcinoides): aspectos gerais. *Prat Hosp.* 2009; ano XI: 63.
65. Zuetenhorst JM, Taal BG. Metastatic carcinoid tumors. A clinical review. *Oncol* 2005; 10:123-31.
66. Bajetta E, Ferrari L, Martinetti A, Celio L, Procopio G, Artale S, et al. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen and hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer.* 1999; 86:858-65.
67. Morbeck IAP, Botan R. Tumores neuroendócrinos. *Prat Hosp.* 2008; ano X, 59.
68. Koopmans KP, Neels OC, Kema IP, Elsinga PH, Sluiter WJ, Vanghillewe K, et al. Improved staging of patients with carcinoid and islet cell tumors with 18F-dihydroxy-phenyl-alanine and 11C-5-hydroxy-tryptophan positron emission tomography. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1489-95.
69. Yarbro JW, Bornstein RS, Mastrangelo MJ (eds). Somatostatin receptor imaging: tumor localization, detection, and therapeutic implications. *Semin Oncol.* 1994; 21(suppl 13):1-71.
70. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Pauwels S, Kvols LK, Reubi JC. Somatostatin receptor scintigraphy. *Nucl Med Ann.* 1995; 1-50.
71. Kwekkeboom D, Krenning EP, de Jong M. Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med.* 2000; 41:1704-1713.
72. Virgolini I, Traub T, Novotny C, Leimer M, Föger B, Li SR, et al. Experience with Indium-111 and Yttrium-90-labeled somatostatin analogs. *Curr Pharm Des.* 2002; 8(20):1781-807.
73. Granberg D, Sundin A, Janson ET, Oberg K, Skogseid B, Westlin JE. Octreoscan in patients with bronchial carcinoid tumors. *Clin Endocrinol.* 2003; 59(6):793-99.
74. Moertel C, Hanley JA. Combination chemotherapy trials in metastatic carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome. *Cancer trials.* 1979; 2(4):327-334.

75. Sippel RS, Chen H. Carcinoid tumors. *Surg Onc Clin N Am*. 2006; 15:463-478.
76. Rozenmam J, Pausner R, Liberman Y, Gamsu G. Bronchial adenoma. *Chest*. 1987; 92:145-47.
77. Detterbeck FC, Rivera MP, Socinski MA, Rosseman JG. Diagnosis and treatment of lung cancer: An evidence based Guide for the Practicing Clinician. Philadelphia: Saunders, 2001; 379-93.
78. Farhat CA, Parra ER, Rogers AV, Elian SN, Sheppard MN, Capelozzi VL. Diagnóstico e prognóstico dos tumores pulmonares neuroendócrinos mediante microscopia eletrônica e análise multivariável de agrupamento. *J Bras Pneumol*. 2008; 34(10):804-11.)
79. Demarchi LM, Reis MM, Palomino SA, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, et al. Prognostic values of stromal proportion and PCNA, Ki-67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2000; 13(5):511-20.
80. Mills SE, Cooper PH, Walker AN, Kron IL. Atypical carcinoid tumor of the lung. A clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Surg Pathol*. 1982; 6(7):643-54.
81. Grote TH, Macon WR, Davis B, Greco FA, Johnson DH. Atypical carcinoid of the lung. A distinct clinicopathologic entity. *Chest*. 1988; 93(2):370-5.
82. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol*. 1997; 15(8):2858-65.
83. Carvalho PE, Antonangelo L, Bernardi FD, Leao LE, Rodrigues OR, Capelozzi VL. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2000; 30(11):478-86.
84. Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, Tateishi M, Sugio K, Sugimachi K. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res*. 1993; 53(20):5000-3.
85. LeeHW, Lee EH, Ha SY, Lee CH, Chang HK, Chang S, et al. Altered expression of micro RNA miR-21, miR-155, and let-7a and their roles in pulmonary neuroendocrine tumors. *Pathol Internat*. 2012; 62:583-591.

86. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992; 70(6):923-35.
87. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*. 1983; 49(6):636-49.
88. Tani EM, Moraes HP, Bacchi CE. Tumores do pulmão: estudo citohistológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico de 16 casos. *J Pneumol*. 1986; 12(4):222-28.
89. Coelho Filho JC, Bandeira AC, Alves VAF. Tumores carcinoides de pulmão: estudo comparativo entre as variantes clássica e atípica com ênfase ao seguimento clínico e aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos. *J Pneumol*. 1998; 14(3):127-32.
90. Yurchenco PD, Smirnov S, Mathus T. Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins. *Methods Cell Biol*. 2002; 69:111-44.
91. Ohori NP, Yousem SA, Griffin J, Stanis K, Stetler-Stevenson WG, Colby TV, et al. Comparison of extracellular matrix antigens in subtypes of bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*. 1992; 16(7):675-86.
92. Cox G, Steward WP, O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax*. 1999; 54(2):169-79.
93. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro JY, Lee JJ, Tu N, et al. Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol*. 1995; 13(8):1893-903.
94. Liotta LA. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. *Am J Pathol*. 1984; 117(3):339-48.
95. Grosso LE. Synthesis of elastin by pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25(1):5-9.
96. Remmele W, Dietz M, Schmidt F, Schicketanz KH. Relation of elastosis to biochemical and immunohistochemical steroid receptor findings, Ki-67 and epidermal growth factor receptor (EGFR) immunostaining in invasive ductal breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993; 422(4):319-26.

97. Watanabe N, Nakajima I, Abe S, Ogura S, Isobe H, Kawakami Y. Staining pattern of type IV collagen and prognosis in early stage adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol*. 1994; 47(7):613-5.
98. Terranova VP, Hujanen ES, Martin GR. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 1986; 77(2):311-6.
99. Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, et al. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol*. 2004; 122(2):256-65.
100. Lohmann W, Schill WB, Bucher D, Peters T, Nilles M, Schulz A, et al. Elastosis and cancer. *Z Naturforsch [C]*. 1994; 49(3-4):223-9.
101. 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.
102. Soga J, Tazawa K. Pathologic analysis of carcinoids. Histologic reevaluation of 62 cases. *Câncer*. 1971; 28(4):990-8.
103. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int*. 1997; 47(7):461-9.
104. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res*. 2001; 7(3):462-8.
105. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002; 296(5574):1883-6.
106. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282(5):C947-70.
107. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(12 Pt 1):2485-92.
108. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89(12):881-6.

109. Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(2):94-5.
110. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(1):4-6.
111. Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, *et al.* Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 1995; 177(1):57-63.
112. Zacharias J, Nicholson AG, Ladas GP, Goldstraw P. Large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinomas with neuroendocrine morphology of lung; prognosis after complete resection and systematic nodal dissection. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75:348-52.
113. Arbiser ZK, Arbiser JL, Cohen C, Gal AA. Neuroendocrine lung tumors: grade correlates with proliferation but not angiogenesis. *Mod Pathol.* 2001; 14(12):1195-9.
114. Stamatis G, Freitag L, Greschuchna D. Limited and radical resection for tracheal and bronchopulmonary carcinoid tumour. Report on 227 cases. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1990; 4(10):527-32; discussion 533.
115. Marty-Ane CH, Costes V, Pujol JL, Alauzen M, Baldet P, Mary H. Carcinoid tumors of the lung: do atypical features require aggressive management? *Ann Thorac Surg.* 1995; 59(1):78-83.
116. Rea F, Rizzardi G, Zuin A, Marulli G, Nicotra S, Bulf R, *et al.* Outcome and surgical strategy in bronchial carcinoid tumors: single institution experience with 252 patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 31(2):186-191.
117. Wilkins EW Jr, Grillo HC, Moncure AC, Scannell JG. Changing times in surgical management of bronchopulmonary carcinoid tumor. *Ann Thorac Surg.* 1984; 38:339-44.
118. Menezetti M, Raveglia F, Panigalli T, Giuliani L, Lo Giudice F, Meda S, Conforti S. Assentment of Outcomes in Typical and Atypical Carcinoids according to Latest WHO Classification. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1838-42.
119. Huang Q, Muzitansky A, Mark EJ. Pulmonary neuroendocrine carcinomas. A review of 234 cases and a statistical analysis of 50 cases treated at one institution using a simple clinicopathologic classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126(5):545-53.

120. Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L, *et al.* Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77(5):1781-5.
121. Vadasz P, Palffy G, Egervary M, Schaff Z. Diagnosis and treatment of bronchial carcinoid tumors: clinical and pathological review of 120 operated patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993; 7(1):8-11.
122. Rea F, Binda R, Spreafico G, Calabro F, Bonavina L, Cipriani A, *et al.* Bronchial carcinoids: review of 60 patients. *Ann Thorac Surg.* 1989; 47(3):412-4.
123. 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; 80:428-33.
124. Oberg, K. Diagnosis and treatment of carcinoid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003; 3(6):863-877.
125. Lamberts SWJ, Bakker WH, Reubi JC, Krenning EP. Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumors. *N Engl J Med.* 1990; 23:1246-1249.
126. Krenning EP, Bakker WH, Breeman WA, Koper JW, Kooij PP, Ausema L, *et al.* Localization of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet.* 1989; 1:242-244.
127. Kvols LK, Brown ML, O'Connor MK, Hung JC, Hayostek RJ, Reubi JC, *et al.* Evaluation of a radiolabeled somatostatin analog (I-123 octreotide) in the detection and localization of carcinoid and islet cell tumors. *Radiology.* 1992; 187:129-133.
128. Buscombe, JR. Radiopeptides from diagnosis to therapy. *Br Arch Biol Technol.* 2002; 45.
129. Filosso PL, Ruffini E, Oliaro A, Papalia E, Donati G, Rena O. Long-term survival of atypical bronchial carcinoids with liver metastases, treated with octreotide. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002; 21(5):913-7.
130. Engstrom PF, Lavin PT, Moertel CG, Folsch E, Douglass HO Jr. Streptozocin plus fluorouracil versus doxorubicin therapy for metastatic carcinoid tumor. *JCO.* 1984; 2:1255-1259.
131. Bukowski RM, Johnson KG, Peterson RF, Stephens RL, Rivkin SE, Neilan B, *et al.* A phase II trial of combination chemotherapy in patients with metastatic carcinoid tumors: a Southwest Oncology Group study. *Cancer.* 1987; 60: 2891-2895.

132. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin: evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. 1991; 68:227-32.
133. Kono T, Shimoda M, Takahashi M, Matsumoto K, Yoshimoto T, Mizutani M, *et al.* Immunohistochemical detection of the lymphatic marker podoplanin in diverse types of human cancer cells using a novel antibody. *Int J Oncol*. 2007; 31(3):501-8.
134. Breiteneder-Gelleff S, Soleiman A, Kowalski H, Reinhard H, Amann G, Kriehuber E, *et al.* Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries. Podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*. 1999; 154(2):385-94.
135. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, *et al.* An essential role for prox 1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*. 2002; 21:1505-13.
136. Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Finegold DN, *et al.* Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by prox 1 homeobox transcription factor. *EMBO J*. 2002; 17:4593-9.
137. Schacht V, Ramirez MI, Hong Y-K, *et al.* T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003;22:3546-56
138. Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M. Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 1997; 20:10-8.
139. Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, *et al.* Molecular identification of Aggrus/T1 alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem*. 2003; 278:51599-605.
140. Schmid K, Birner P, Gravenhorst V, End A, Gelleff S. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of lung. 2005; 29(3):324-8.
141. Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, *et al.* The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol*. 2007; 170(4):1337-47.
142. Ross W, Hall PA. KI67: from antibody to molecule to understanding? *J Clin Pathol*. 1995; 48:113-17.

143. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterisation of cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki67. *Am J Pathol.* 1991; 138:867-73.
144. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. The production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983; 31:13-20.
145. Scholsen T, Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the know and the unknow. *J Cell Physiol.* 2000 Mar; 182(3):311-22.
146. Verheijen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO, Boehmer, ALM, van Driel R, Brakenhoff GH, *et al.* Ki67 detects a nuclear matrix association proliferation related antigen. I. Intracellular location during mitosis. *J Cell Sci.* 1989; 92:123-30.
147. Verheijen R, Kuijpers HJH, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, *et al.* Ki67 detects a nuclear matrix associated proliferation related antigen. II. Localisation in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci.* 1989; 92:531-40.
148. Van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde C, Comelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1989; 49:2999-3006.
149. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol* 2014 Mar; 9(3):273-84 (ahead of print).
150. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990 Jun; 1(3):199-206.
151. Dazzi C, Cariello A, Maioli P, Solaini L, Scarpi E, Rosti G, *et al.* Prognostic and predictive value of intratumoral microvessels density in operable non small lung cancer. *Lung cancer.* 1999; 24(2) 81-8.
152. Ouaïssi M, Julié C, Mitry E, Sielezneff I, Jimenez P, Loundou A, *et al.* Prognostic factor of recurrence for resected digestive endocrine tumors. *B Hepatogastroenterology.* 2009; 56(93):1183-9
153. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D - many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2008; 68(Issue 1):12-28.

154. Goldstraw P. Staging manual in thoracic oncology. 2009. Rx Press. Orange Park, FL, USA.
155. Moraes-Neto DM. Predição do risco individual de micrometástase do tumor carcinoide típico broncopulmonar em função de variáveis clínicas, anatomopatológicas e biomarcadores teciduais [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.
156. Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, Rohan T, Aragaki A, Lane D, *et al.* Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. *J Nat Cancer Inst.* 2005; 97:439-448.
157. Schreurs AJ, Westermann CJ, van den Bosch JM, Vanderschueren RG, Brutel de la Rivière A, Knaepen PJ. A twenty-five year follow up of ninety-three resected typical carcinoid tumors of the lung. *J Cardiothorac Surg.* 1992; 104(5):1470-5.

9. Apêndice

Apêndice - A

Quadro 1 -Classificação dos tumores neuroendócrinos segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)

1 - Tumores neuroendócrinos formadores de glândulas	
Localização	Denominação
Hipófise	Adenoma
Paratireoide	Adenoma/carcinoma
Neuroglia	Paraganglioma
Medula das suprarrenais	Feocromocitoma
2 - Tumores neuroendócrinos disseminados	
Localização	Denominação
Trato gastrintestinal	Tumor/ carcinoide neuroendócrino
Pâncreas endócrino	Tumor/carcinoma neuroendócrino
Trato hepatobiliar	Tumor/carcinoma neuroendócrino
Trato respiratório	Carcinoide/Carcinoma neuroendócrino
Timo	Carcinoide
Células C da tireoide	Carcinoma medular de tireoide
Trato urogenital	Carcinoide
Pele	Carcinoma das células de Merckel

FONTE: adaptado de Solcia RG, Kloppel G e Solbin LH. (2000)²⁰.

Quadro 2 - Critérios de Arrigoni

Características	Carcinoide atípico
Arquitetura	Desorganizada
Celularidade (comparada com o carcinoide típico)	Aumentada
Necrose	Focal
Núcleo	Moderada hiperchromasia
Atividade mitótica	5-10/10 HPF
Nucléolo	Proeminente
Sobrevivência	70% metástase, 30% óbito, sobrevivência média 27 meses.

FONTE: adaptado de Arrigoni³⁹.

Quadro 3 - Critérios de Travis *et al.* para distinção entre carcinoma de células pequenas e carcinoma neuroendócrino de células grandes³⁸

Histologia	Carcinoma de células pequenas	Carcinoma neuroendócrino de células grandes
Célula	Pequena (menos de três linfócitos)	Grande
Razão núcleo/citoplasma	Alta	Pequena
Cromatina nuclear	Uniforme	Menos uniforme
Nucléolo	Ausente ou fraco	Comumente presente (proeminente ou fraco)
Forma do núcleo	Característica	Menos proeminente
Forma fusiforme	Comum	Incomum
Forma poligonal com citoplasma róseo	Incaracterístico	Característico
Mancha nuclear	Frequente	Incomum
Coloração basofílica de vasos e estroma	Ocasional	Raro

Quadro 4 - Critérios de Travis *et al.* usados para a classificação histológica dos tumores neuroendócrinos do pulmão^{41,42}

Tumor	Diâmetro da célula (micra)	Necrose	Mitoses (10 CGA)	Contorno nuclear	Nucléolo
Tumor carcinoide típico	50-70	0	< ou = 2	Regular (0)	Ausente(0)
Tumor carcinoide atípico	40-50	+a++	3 a 9	Irregular (+)	Ausente/presente (0a+)
Carcinoma grandes células	40-60	++a+++	>10	Irregular (+ a ++)	Ausente/presente (+a+++)
Carcinoma pequenas células	15-30	++a+++	>10	Irregular (+++)	Ausente/presente (0a+)

FONTE: Travis *et al.* (1998)^{41,42}.

Quadro 5 - Características clínicas do tumor carcinoide broncopulmonar típico e atípico^{56,57}

Características	Carcinoide típico	Carcinoide atípico
Idade média	45 anos	55 anos
Tabagismo	Sem relação	Sem relação
Metástases linfonodais ao diagnóstico	5 a 15%	40 a 48%
Metástases à distância ao diagnóstico	Rara	20%
Sobrevida 5 anos	90 a 95%	58%
Sobrevida livre de doença (10 anos)	90 a 95%	95%

Anexo A – Parecer ético

HCFMUSP

APROVAÇÃO

A 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 27/10/2010, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0572/10, intitulado: "PREDIÇÃO DO RISCO INDIVIDUAL DE METÁSTASE LINFÁTICA, HEMATOGÊNICA E DE ÓBITO DE PACIENTES OPERADOS POR TUMOR CARCINÓIDE TÍPICO BRONCOPULMONAR EM FUNÇÃO DE VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, ANATOMOPATOLÓGICAS E DA QUANTIDADE DE IMUNOEXPRESSION DA PODOPLANINA, DA PROTEÍNA NUCLEAR KI 67 E DA CATEPSINA D 34" apresentado pela COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa [Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. João Carlos das Neves Pereira

Pesquisador (a) Executante: ALYNE FONSECA DE VILHENA

CAPPesq, 29 de Outubro de 2010



Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa



Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492