

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS TUMORES
NEUROENDÓCRINOS**

GUSTAVO HENRIQUE SOARES TAKANO

BRASÍLIA – 2007

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DOS TUMORES
NEUROENDÓCRINOS**

GUSTAVO HENRIQUE SOARES TAKANO

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas**

**Orientador: Florêncio Figueiredo
Cavalcanti Neto**

BRASÍLIA – 2007

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Vieira Lopes, pelo coleguismo e solidariedade.

Às Dras. Leonora Maciel Vianna, e Maria de Nazareth Machado Sobreira, pelo apoio nas horas certas.

À Profa. Dra. Ana Amélia Lorenzetti Bocca, pelos ensinamentos essenciais transmitidos na disciplina correlata à metodologia deste trabalho, e pelo empenho na realização das reações de imunoistoquímica deste trabalho.

À Sra. Viviane Montanari Leal, pelo brilhantismo do trabalho técnico e disposição a serviço da pesquisa.

Ao Professor Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pela gentileza de trato, compreensão pelo tempo e pela cessão de material para pesquisa.

Ao Dr. Teodoro Ostrowski, pela gentileza na cessão de material para pesquisa.

À Dra. Raïssa de Paula Menezes, pela gentileza na cessão de material para pesquisa.

Ao Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto, pela orientação, liderança, atitude e principalmente, pela perseverança.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificações comparativas dos tumores neuroendócrinos.....	22
Tabela 2 - Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos, conforme a OMS	34
Tabela 3 – Relação de marcadores utilizados, diluições e seus respectivos clones	36
Tabela 4 - Intensidade de coloração à Imunoistoquímica, conforme a SBP.....	37
Tabela 5 - Casos selecionados para estudo, conforme laboratório de origem, idade, sexo e doença.....	40
Tabela 6 - Valor de p para os testes paramétricos, das médias de idade em grupos conforme escores dos marcadores	50
Tabela 7 - Valores de p para o teste do Qui-quadrado (Pearson), entre as variáveis qualitativas de estudo e marcadores.....	51
Tabela 8 - Frequência dos Escores da e-Caderina em dois níveis conforme localização do tumor. $p = 0,038$	51
Tabela 9 - Frequência de Escores do marcador ki67 conforme classificação da OMS. $p = 0,050$	52
Tabela 10 - Valores de p para o teste do Qui-quadrado (Pearson), para a variável benignidade/malignidade de tumores e reatividade a marcadores	52
Tabela 11 - Frequências de escores para ki67 conforme benignidade/malignidade dos tumores. $p = 0,004$	53
Tabela 12 - Valores de p para o teste do Qui-quadrado (Pearson), para as variáveis topográficas recodificadas e marcadores.....	53
Tabela 13 - Frequência de escores do marcador S100 em dois níveis, conforme a localização trato digestório. $p=0,035$	54

Tabela 14 - Frequência de escores do marcador S100 em quatro níveis, conforme a localização trato digestório. $p = 0,063$	54
Tabela 15 - Frequência de escores do marcador Sinaptofisina em dois níveis, conforme a localização trato digestório.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto histológico de um tumor neuroendócrino. H&E. a e b, carcinóide brônquico, objetiva de 10x; c, objetiva de 20x; d, carcinoma neuroendócrino pulmonar, objetiva de 10x.	17
Figura 2 - Carcinoma neuroendócrino em reto. Aspecto nuclear de um tumor neuroendócrino. H&E; a, objetiva de 40x; b, objetiva de 100x; c e d, objetiva de 100x e aproximação digital. 18	18
Figura 3 - Frequências em faixas de idade conforme o sexo	41
Figura 4 - Frequências percentuais dos tumores conforme a classificação da OMS	42
Figura 5 - Frequências dos tumores conforme a classificação em dois estratos	42
Figura 6 – Frequências percentuais conforme a localização topográfica tumoral	43
Figura 7 - Frequências de positividade da reação para os diferentes marcadores.....	44
Figura 8 - Carcinoma medular de Tireóide. Imunomarcação score 4, padrão citoplasmático. Marcador sinaptofisina, objetiva de 10x.	45
Figura 9 - Carcinóide brônquico. Imunomarcação Score 4. Marcador cromogranina, Objetiva de 40x.	45
Figura 10 - Paraganglioma. Marcação score 3. Notar positividade em células do arcabouço estromal. Marcador S100, objetiva de 20x.	46
Figura 11 - Carcinóide brônquico. imunomarcação score 0. Notar o controle interno fortemente positivo em glândulas adjacentes � lesão. Marcador 34�e12, objetiva de 10x.	46
Figura 12 - Carcinoma neuroendócrino do reto. Imunomarcação score 3. Marcador ki67, objetiva de 20x.	47
Figura 13 - Carcinoma neuroendócrino de pulmão. Imunomarcação score 1. marcador p53, objetiva de 40x	47

Figura 14 - Carcinoma neuroendócrino brônquico. Imunomarcação escore 2. Marcador VEGF, objetiva de 20x. Observar a negatividade em células inflamatórias.....	48
Figura 15 - Paraganglioma. Imunomarcação escore 3. Marcador E-caderina, objetiva de 40x.	48
Figura 16 – Carcinoma medular de tireóide. Imunomarcação escore 3. Marcador c-kit, objetiva de 20x.	49
Figura 17 - Carcinoma de pequenas células do pulmão. Imunomarcação escore 2. Marcador CD99, objetiva de 20x.....	49

SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

β	beta
μL	Microlitros
μm	Micrometros
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACTH	Hormônio corticotrópico adrenal
ANOVA	Analysis of Variance
APUD	amine precursor uptake and decarboxylation
BSA	Soro albumina bovina
CD	Cluster of differentiation
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Et al	e outros
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
H&E	Hematoxilina e Eosina
HUB	Hospital Universitário de Brasília
LIB	Laboratório de Imunopatologia de Brasília
LSAB	Large Streptavidin-Avidin-Biotin – System Peroxidase

M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	Milímetro
NBR	Norma Brasileira
N-CAM	Molécula de adesão neural
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Valor p, significância estatística de um teste.
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução tampão de fosfato de sódio
PBS-BSA	Soro albumina bovina diluído em solução tampão
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucléico
SBP	Sociedade Brasileira de Patologia
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
UnB	Universidade de Brasília
V	volumes
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular

RESUMO

Os tumores neuroendócrinos são um conjunto de neoplasias agrupadas por características morfofuncionais em comum porém de grande variabilidade de sítios de acometimento, histogênese, apresentação clínica e prognóstico. O presente estudo afere o perfil de imunomarcção, com o objetivo de caracterização da histogênese e correlação com fatores determinantes de seu comportamento biológico. Foram selecionados 20 casos de peças cirúrgicas com o diagnóstico histopatológico de neoplasias neuroendócrinas. Reações imunoistoquímicas com anticorpos específicos para identificar as proteínas Sinaptofisina, Cromogranina, Ki67, p53, c- kit, VEGF, e- caderina, 34 β E12, CD99, e S100 foram empregadas. A expressão foi medida em escalas em dois e quatro níveis, e suas frequências foram comparadas às médias ou frequências das demais variáveis do estudo – idade, sexo, localização tumoral, classificação conforme a OMS, e classificação em dois níveis prognósticos. A avaliação dos resultados demonstra que para a Cromogranina a imunoexpressão moderada a forte foi observada em 95% dos casos, enquanto que CD99 e 34 β E12 foi observada em apenas em 5% dos casos. A marcação do ki67 foi mais intensa nos tumores malignos. A expressão da proteína E-caderina foi mais frequentemente observada nas neoplasias não pertencentes aos tratos digestório e respiratório. Os tumores neuroendócrinos do aparelho digestório apresentam, respectivamente, pouca expressão para a proteína S100 e elevada expressão para Sinaptofisina. As demais variáveis não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados estabelecem correlação com a histogênese. Verifica-se aparente especificidade das neoplasias com a Cromogranina, e Sinaptofisina, e ki-67, além da inespecificidade para 34 β E12. Verifica-se ainda que algumas destas proteínas são mais observadas em tumores de sítios específicos, como S100, e a E-caderina. VEGF, CD99, p53 e c-kit são expressos em pequenos subconjuntos destes tumores, não correlatos às variáveis estudadas.

ABSTRACT

Neuroendocrine tumours are a group of neoplasias that share morfofuncional characteristics but have a great variety of location, histogenesis, clinical presentation and prognosis. This study tests the immunohistochemistry profile of immunostaining to determine histogenetic characteristics and correlations with biological behavior determining factors. Twenty retrospective neuroendocrine tumors cases were selected and submitted to immunohistochemistry reaction with specific antibodies against synaptophysin, chromogranin, Ki67, p53, c- kit, VEGF, E-cadherin, 34 β E12, CD99, e S-100. The immunoreactivity was scaled into a two and four-levels scale, and its frequencies were compared to the other variables – age, sex, location, classification according to WHO and classification in two prognostic levels. Chromogranin was the most frequent marker, with moderate to strong immunoexpression in 95% of the cases, and the least frequent markers were CD99 and 34 β E12, in 5%. Ki67 reaction was stronger in malignant tumors. E-cadherin was more frequently observed in tumours outside digestive and respiratory sites. The neuroendocrine tumours of the digestive tract had, respectively, S100 low expression and synaptophysin high expression. All the other variables tested were not statistically significant. This results made a histogenetic correlation. There is apparently specificity with chromogranin, synaptophysin and ki-67, and there is not with 34 β E12. Some of this proteins are more frequent in specifical sites, as S100 and E-cadherin. VEGF, CD99, p53 and c-kit are expressed in small and not correlated to the studied variables subgroups of tumours.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	vi
Siglas e Abreviaturas Utilizadas.....	viii
Resumo	x
Abstract.....	xi
Sumário.....	xii
1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. O sistema neuroendócrino.....	15
2.2. Tumores neuroendócrinos.....	17
2.2.1. Definição.....	17
2.2.2. Classificação	20
2.2.3 Epidemiologia.....	22
2.3. Os marcadores imunoistoquímicos	23
2.3.1. Sinaptofisina	24
2.3.2. Cromogranina A	24
2.3.3. Ki67	25
2.3.4. c- Kit.....	25
2.3.5. VEGF	27
2.3.6. E - caderina	27
2.3.7. 34βE12.....	27
2.3.8. p53	28
2.3.9. CD99.....	28
2.3.10. S-100.....	29
3. Objetivo do estudo.....	31
4. Materiais e Métodos	33
4.1. Critério de inclusão	33
4.2. Critérios de exclusão	33
4.3. Confirmação diagnóstica.....	34
4.4. Exame imunoistoquímico.....	35
4.5. Leitura das lâminas	37
4.6. Análise estatística.....	37
4.7. Adequação às normas.....	38
5. Resultados.....	40
5.1. Da amostragem.....	40
5.2. Dos marcadores.....	44
5.3. Da correlação entre marcadores e demais variáveis	50

5.3.1. Testes estatísticos paramétricos	50
5.3.2. Testes estatísticos não paramétricos	50
6. Discussão	56
7. Conclusão	66
8. Referências Bibliográficas	68
9. Anexos	74
9.1. Tabela completa dos resultados	75
9.2. Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido	76
9.3. Anexo 3 - Termo de compromisso para uso de dados em arquivo	77
9.4. Anexo 4 - Autorização para empréstimo de blocos de parafina para pesquisa científica	78
9.5. Anexo 5 – Parecer FM/UnB.....	79

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos são neoplasias que contêm grande variabilidade morfológica e de prognóstico. Agrupadas sob a mesma denominação, possuem variação de etiologia, patogenia, apresentações clínicas, morfologia, prognóstico e tratamento. Além de existirem numerosas variáveis a serem consideradas, muitas vezes estas são interdependentes, e conseqüentemente de difícil estudo.

No presente momento, há poucas variáveis correlatas ao prognóstico, pois lesões semelhantes à microscopia óptica convencional podem ter comportamentos biológicos completamente diversos, e algumas diferenças morfológicas não se refletem como fatores prognósticos (DELELLIS e OSAMURA, 2006).

Supõe-se que existam diferenças da expressão de proteínas correlacionadas a diversas etapas da diferenciação celular e carcinogênese, e a morfologia dos carcinomas à histologia óptica convencional. Por meio de uma técnica disponível comercialmente, e de comprovada reprodutibilidade - a imunoistoquímica - espera-se colaborar para o refinamento diagnóstico destes tumores.

Antígenos que possam ser correlacionados à classificação das mesmas, poderão não apenas ser somados aos já descritos marcadores prognósticos, mas também reforçar os critérios da definição dessa entidade. E ainda, caso se identifiquem proteínas pertencentes a mecanismos da gênese tumoral, haverá mais evidências que possam contribuir com a pesquisa de novos alvos às terapêuticas mais recentes, ou àquelas que ainda estão por vir.

O presente estudo, empregando uma série de marcadores disponíveis, agregará dados para o discernimento entre as similaridades ou diferenças nas freqüências de expressão quando comparados a dados morfológicos dos tumores testados. Indicar rumos para a padronização diagnóstica e gerar evidências para auxiliar a tomada de decisão terapêutica é um desafio que merece a atenção da pesquisa em ciências da vida.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O sistema neuroendócrino

Historicamente, o sistema neuroendócrino é resultante da expansão de conceitos sobre o sistema endócrino. Estudos clássicos de Heidehan, Masson e Hamperl foram os primeiros a sugerir, por meio de colorações argirófilas, que células associadas a mucosas atuam como um sistema endócrino difusamente distribuídos pelos mesmos (DELELLIS e DAYA, 1997). Pequenos grupamentos destas células são encontrados na mucosas do trato digestório, trato respiratório, ductos mamários e pele.

O acrônimo APUD, do inglês *amine precursor uptake and decarboxylation*, descreve o mecanismo da capacidade de armazenar aminas através de enzimas como a colinesterase. Esta capacidade é reconhecida como um sinal de ancestralidade neural. Assim, células com estas características foram descritas como de provável origem ectodérmica, da crista neural, e analogamente aos neurônios, são capazes de excretar peptídeos com ações parácrinas e/ou endócrinas. O mecanismo, descrito inicialmente com os estudos das células C da tireóide, foi posteriormente expandido, a incluir células em diversos tecidos, como paragânglios e medula adrenal, pâncreas endócrino, pituitária e outros (PEARSE, 1969).

Entretanto, estudos posteriores mostram que este mecanismo de funcionamento neuroendócrino está presente também em tecidos e tumores não ectodérmicos, sem depender da ancestralidade da crista neural (LANTUEJOUL *et al.*, 1998; YESNER, 2000; 2001). A presença do mecanismo APUD não é exclusiva de células oriundas da crista neural, mas ocorre também em diversos outros tecidos, como em células gastrointestinais, de origem embrionária endodérmica do intestino primitivo anterior (VAN EEDEN e OFFERHAUS, 2006).

Não obstante a presença de origem na crista neural, ou mecanismo APUD, existem

também pesquisadores que definem de uma maneira prática, como célula neuroendócrina aquela que possuir marcadores relacionados ao mecanismo APUD, considerando mais importante as suas características funcionais que aspectos morfológicos (TAUPENOT *et al.*, 2003).

Morfologicamente, estas células não têm padrão distinto, podendo ser ovais, piramidais, ou irregulares. Em geral, seu citoplasma é claro, podendo conter grânulos eosinofílicos. A depender do tipo de neuromônio que a célula secreta, podem corar com relativa especificidade à reações histoquímicas diversas, por redução da prata. Devido à este fato, obtiveram ao longo do tempo algumas designações, como as células enterocromafins, argirófilas, ou ainda argentafins (DELELLIS e DAYA, 1997).

As metodologias de imunomarcção foram decisivas na ampliação do conceito de célula neuroendócrina, bem como dos tumores à esta relacionados. Trata-se de uma técnica já consagrada, de grande valia diagnóstica, que a cada dia se renova com o desenvolvimento de novos anticorpos específicos. (JAFFER e BLEIWEISS, 2004). Assim, com alvos orientados a proteínas do mecanismo APUD, ou ainda a fragmentos de hormônios detectáveis em ensaios séricos ou parácrinos, pode-se afirmar que determinadas células ou apresentam diferenciação neuroendócrina.

Como exemplo, a cromogranina A é uma proteína constituinte de cerca da metade dos grânulos de secreção neuroendócrinos, e o mais prevalente dos marcadores neuroendócrinos (TAUPENOT *et al.*, 2003; ERICKSON e LLOYD, 2004). Tal característica o fez ser considerado por si só diagnóstico de diferenciação neuroendócrina nas células que a expressam. Igualmente úteis são os anticorpos contra catecolaminas e a proteína S-100. Esta última, relacionada a bomba de cálcio, reforça que a maquinaria celular das células neuroendócrinas com similaridade aos neurônios, pois assim como esses, expressam esta proteína no citossol (ERICKSON e LLOYD, 2004).

Além destes marcadores, somam-se a cada dia novos peptídeos e proteínas a estas relacionadas, que podem servir como alvo antigênico à imunomarcção, como por exemplo, a

N-CAM, uma das moléculas de adesão neural (LANTUEJOUL *et al.*, 1998).

2.2. Tumores neuroendócrinos

2.2.1. Definição

A primeira descrição dos tumores neuroendócrinos foi feita por Öberendorfer, em 1907, cunhando o termo carcinóide para descrevê-lo. (DELELLIS e DAYA, 1997). Tratavam-se de neoplasias de morfologia similar, com organização tecidual própria, organóide, formando aglomerados esféricos celulares por ele descritos como “Zellballen”. A figura 1 mostra um exemplo desta disposição tissular.

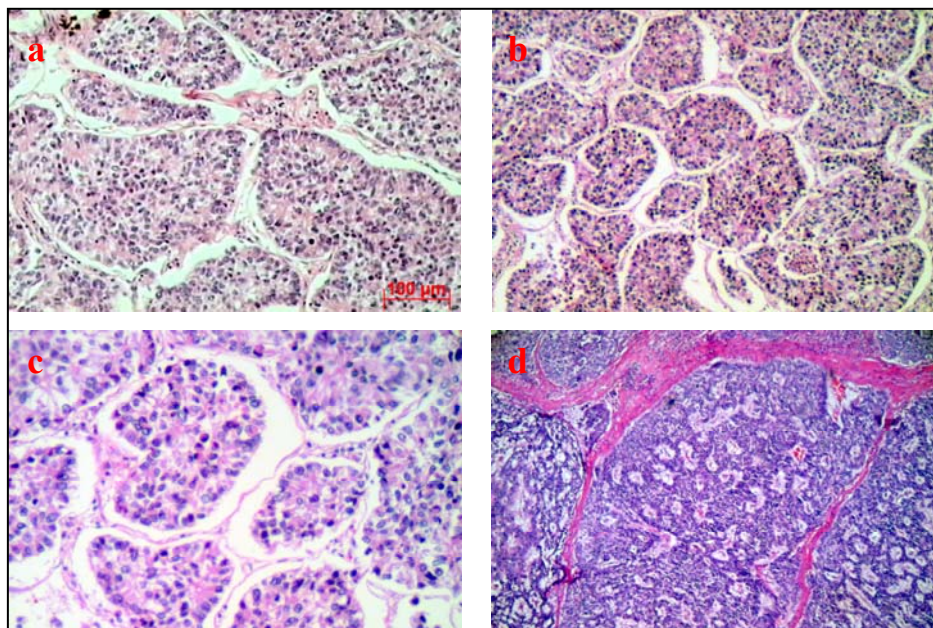


Figura 1 - Aspecto histológico de um tumor neuroendócrino. H&E. a e b, carcinóide brônquico, objetiva de 10x; c, objetiva de 20x; d, carcinoma neuroendócrino pulmonar, objetiva de 10x.

O tipo nuclear é também reconhecível, com núcleos vesiculares com reforço tintorial na membrana nuclear, e granulações grosseiras. A figura 2 mostra este aspecto nuclear comum aos tumores neuroendócrinos, que é descrito como “sal e pimenta”. (DELELLIS e DAYA, 1997)

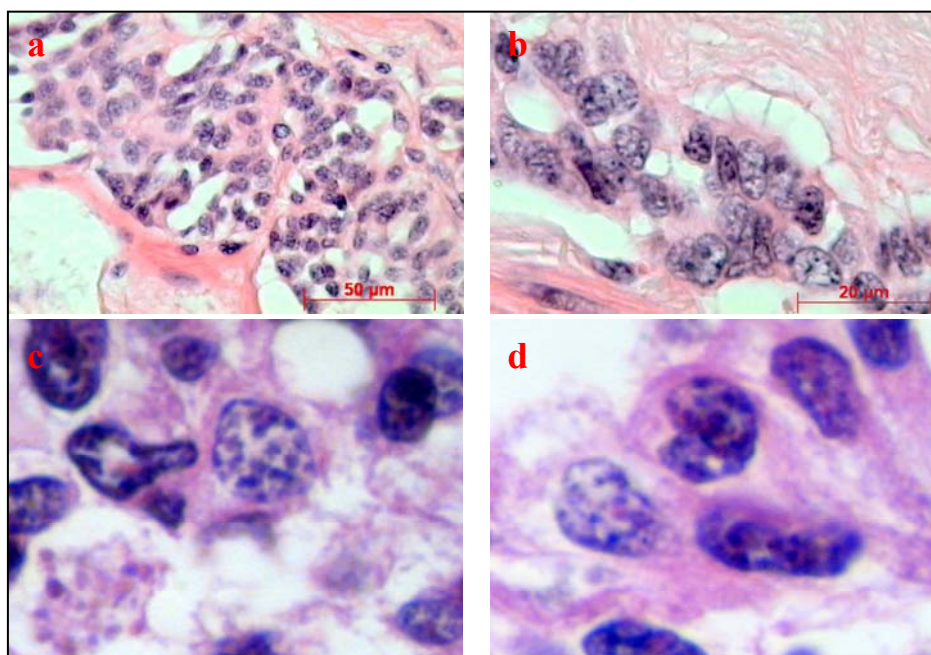


Figura 2 - Carcinoma neuroendócrino em reto. Aspecto nuclear de um tumor neuroendócrino. H&E; a, objetiva de 40x; b, objetiva de 100x; c e d, objetiva de 100x e aproximação digital.

A característica morfológica é ainda a mais importante ferramenta diagnóstica destes tumores (DELELLIS e OSAMURA, 2006).

Com a evolução da precisão diagnóstica, empregando-se técnicas de identificação dos neuropeptídeos principalmente pelo uso da imunistoquímica na rotina, tornou-se um grupo muito mais heterogêneo de doenças, pois incluiu algumas neoplasias anteriormente descritas apenas como carcinomas indiferenciados em diversos órgãos (BARAKAT *et al.*, 2004; VAN EEDEN e OFFERHAUS, 2006).

A classificação destas neoplasias é muito controversa, devido a sua variabilidade morfológica, mas principalmente, do comportamento biológico. A exemplo, neoplasias por vezes com a mesma nomenclatura, como um corticotropinoma – tumor produtor do hormônio

corticotrópico, o ACTH – pode ser uma neoplasia pituitária delimitada ou um tumor pulmonar extenso. Mesmo entre tumores de morfologia similar àqueles descritos por Öberendorfer, os carcinóides, é possível observar comportamentos biológicos diversos, como os benignos carcinóides pulmonares quando comparados aos agressivos similares no timo ou em parte do tubo digestório, como o do ceco (DELELLIS e OSAMURA, 2006).

A controvérsia é tanta que em recente trabalho de revisão, dois dos editores responsáveis pela classificação da OMS afirmam:

“Não há, talvez, outra área na patologia contemporânea que tenha gerado tanta controvérsia como a classificação e nomenclatura dos tumores do sistema neuroendócrino” (DELELLIS e OSAMURA, 2006).

A definição mais natural e abrangente de tumor neuroendócrino correlacionam a sua origem nas células APUD. Nestes, incluem-se os carcinóides e os tumores gastroenteropancreáticos não carcinóides, como o insulinoma, gastrinoma, VIPoma; os tumores secretores de catecolaminas, como os feocromocitomas, paragangliomas, ganglioneuroblastomas, ganglioneuromas, neuroblastomas; carcinomas medulares da tireóide e da mama; tumores cromófobos da pituitária, tumores de pequenas células do pulmão e das células de Merckel da pele. (DELELLIS e OSAMURA, 2006)

É de senso comum que a nomenclatura carcinóide não mais satisfaz o conceito destas neoplasias, uma vez que não engloba o total das neoplasias com características neuroendócrinas. Da mesma forma, o uso inadequado desta terminologia provocou impropriedades ainda maiores para seu uso corrente (BARAKAT *et al.*, 2004; OSAMURA *et al.*, 2006).

A Organização Mundial da Saúde - OMS - tem uma visão ainda mais ampla dos tumores neuroendócrinos, considerando ainda aqueles que têm expressão neuroendócrina no perfil de imunomarcção, a despeito da origem embrionária dos mesmos (CAPELLA *et al.*, 1995; SOLCIA *et al.*, 2000). Na segunda edição de sua classificação, inclusive, abole o

prefixo “neuro”, considerando estas neoplasias como endócrinas, consolidando a visão de equivalência e paralelismo morfofuncional entre células e tumores neurais e endócrinos. Para fins de estudo pormenorizado e protocolos de tratamento, a OMS sugere classificações que serão tratadas a seguir.

2.2.2. Classificação

Os tumores neuroendócrinos, historicamente, não eram classificados como um grupo de neoplasias, e sim como formas de diferenciação distinta de adenomas e carcinomas em várias topografias. Neoplasias como carcinoma medular de mama e tireóide, os paragangliomas, tumores da medula adrenal e outros não eram, pela maioria das classificações usualmente empregadas até então, considerados como neoplasias similares, participando cada qual de uma família diversa de neoplasias (DELELLIS e OSAMURA, 2006).

Um conceito unificador é que nos tumores neuroendócrinos inexistem característica morfológica que os dicotomizem em neoplasia de comportamento biológico “benigno” ou “maligno”. Assim, apenas a prova do comportamento maligno – a metástase, é capaz de distingui-los inequivocamente. Inclusive, esta permanece o único parâmetro aceito como diagnóstico para malignidade dos feocromocitomas e paragangliomas extra-adrenais (DELELLIS *et al.*, 2003).

A evolução dos conceitos em neoplasias endócrinas acabou por gerar uma série de classificações cada vez mais apuradas, capazes de predizer, ainda que de maneira limitada, o comportamento biológico em grupos destas neoplasias. A principal dificuldade é graduar estas neoplasias em estratos que possam ser transpostos para as demais topografias, por meio de critérios facilmente reprodutíveis.

Entre algumas tentativas, ressaltam-se aquelas que contribuíram para a classificação vigente da OMS. Nestas, o perfil fenotípico das lesões é o critério de inclusão

inicial, e portanto não excluem as neoplasias de origem comprovadamente não-ectodérmica. Desta forma, o conhecimento ainda incompleto da histogênese destes tumores (HELPAP e KOLLERMANN, 2001) não impede o seu estudo como bloco de doenças.

Estas classificações, que são baseadas em trabalhos anteriores de alguns dos autores da classificação vigente da OMS (CAPELLA *et al.*, 1994; 1995; TRAVIS *et al.*, 1998), fazem agora parte das classificações de tumores da OMS para órgãos específicos.

Baseado em trabalhos anteriores e sua própria casuística, Travis e colaboradores (TRAVIS *et al.*, 1998) consolidaram uma classificação com a subdivisão dos tumores pulmonares em três graus. Esta classificação foi agregada pela OMS (SOLCIA *et al.*, 2000) e transposta aos demais tumores endócrinos, apesar de não ser completamente aplicável a todas as topografias.

Mesmo não sendo totalmente abrangente, é possível fazer um paralelismo entre as mesmas, considerando os graus de prognóstico, de forma comparada. Isolando o grupo das neoplasias do intestino anterior primitivo - pâncreas, pulmão e vias aéreas baixas, e do aparelho digestório, é possível um paralelismo quase que perfeito, com quatro graus de comportamento biológico presumível por achados morfológicos (VAN EEDEN *et al.*, 2002). As demais topografias podem ser conceitualmente incluídas em um destes estratos, ainda que arbitrariamente (DELELLIS e OSAMURA, 2006).

São reconhecidos pela OMS como endócrinos os tumores da pituitária, os paragangliomas e os tumores do sistema nervoso autônomo, carcinomas medulares da tireóide; tumor de Merckel da pele; carcinoma neuroendócrino da mama, colo uterino e vagina; teratomas monodérmicos do grupo carcinóide, carcinóides e carcinomas neuroendócrinos do trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, próstata e pulmão (SOLCIA *et al.*, 2000; TRAVIS *et al.*, 2004).

Esta classificação usa, para discernir entre os graus, as características histopatológicas e biológicas, como o grau celular; o tamanho, localização do tumor primário,

marcadores de proliferação celular, invasividade local e vascular, e a produção de substâncias biologicamente ativas. As três faixas comparadas estão sumarizadas na tabela 1. A última linha corresponde à classificação da OMS.

Tabela 1- Classificações comparativas dos tumores neuroendócrinos

<i>Baixo Grau</i>	<i>Grau intermediário</i>	<i>Alto grau</i>
Carcinóide	Carcinóide atípico	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células; de grandes células
Tumor neuroendócrino bem diferenciado	Carcinoma neuroendócrino bem diferenciado	Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado
Carcinoma neuroendócrino grau I	Carcinoma neuroendócrino grau II	Carcinoma neuroendócrino grau III
Tumor endócrino bem diferenciado	Carcinoma endócrino bem diferenciado	Carcinoma endócrino pouco diferenciado

Fonte: Adaptado de (DELELLIS e OSAMURA, 2006)

Há ainda uma subclassificação muito conveniente e usada em trabalhos científicos. Muitos tratam como tumores neuroendócrinos apenas aqueles oriundos do intestino anterior primitivo, por compartilharem provavelmente a mesma origem nos folhetos embrionários. Neste grupo estão a maior parte dos trabalhos e, conseqüentemente, do conhecimento em neoplasias neuroendócrinas (VAN EEDEN *et al.*, 2002).

2.2.3 Epidemiologia

Como um grupo de neoplasias heterogêneo, o estudo de sua incidência na população geral é também fragmentado a cada topografia. São raros os estudos epidemiológicos para este tipo de neoplasia que o fazem de maneira mais abrangente.

Modlin e colaboradores (2003), utilizando-se a coorte do sistema de notificação de carcinomas norte-americano, calculou a taxa de incidência nos Estados Unidos variando entre 2,44 e 4,48 para cada 100.000 habitantes. Dentre estes casos, destacam-se a maior incidência dos tumores gastrointestinais (62,5%), seguidos pelo pulmão (25,3%) e ovário (1,4%). Este mesmo estudo mostra incidência discretamente mais elevada nos grupos de indivíduos do

sexo masculino de raça negros (MODLIN *et al.*, 2003).

Um estudo meta-analítico, utilizando-se de casos de 64 países, revela perfil similar. Neste, 64% dos casos são gastrointestinais e 19,8% pulmonares, estando o restante distribuídos nos diversos órgãos. Porém, por não se tratar de um estudo de coorte, não há cálculo de taxas de incidência. Neste estudo, não há diferenças por sexo, e não afere raça na sua metodologia (SOGA, 2003).

Quando estudados apenas os tumores dos sistemas gastroenteropancreáticos e pulmonares, há dados mais concretos. Um estudo holandês indica que os tumores neuroendócrinos malignos são 0,5% de todas as neoplasias malignas, com prevalência de 2/100.000 habitantes (TAAL e VISSER, 2004). Neste trabalho verifica-se que o sítio de predileção é o trato gastrointestinal, com 62 a 67%, seguido, do pulmão, com 22-27%. Quanto à sobrevida em cinco anos, o trabalho estima 93% em doença local, 74% nas com acometimento regional e apenas 19% nas doenças com metástase à apresentação clínica. O trabalho ainda afirma que, exceto pela correlação com a síndrome da neoplasia endócrina múltipla tipo I, não são evidentes outros fatores preditivos ou associados.

A percepção do aumento na incidência deste tipo de neoplasia tem sido verificada. Taal e Visser (2004) ponderam que, provavelmente, isto é devido ao surgimento de novas ferramentas – entre elas o exame imunoistoquímico e o maior entendimento morfológico destas lesões – do que uma tendência secular. Este trabalho aponta uma ligeira preponderância em mulheres abaixo de 50 anos, devido a maior incidência nesta população de comprometimento do apêndice cecal. Este é o único dos três trabalhos aqui citados que conclui sobre faixa etária, os demais apontam apenas a extrema raridade de casos em crianças e adolescentes.

2.3. Os marcadores imunoistoquímicos

A técnica de imunoistoquímica vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada desde a

década de 1960, e os métodos mais utilizados descendem de trabalhos pioneiros, destacando-se a introdução da peroxidase na amplificação da reação, tornando-a facilmente reprodutível em materiais emblocados em parafina (STERNBERGER *et al.*, 1970).

Vários destes marcadores são utilizados em rotina e pesquisa para os tumores neuroendócrinos. A presente seleção envolve critérios de disponibilidade comercial, além das evidências científicas de seu uso como marcadores diagnósticos ou prognósticos.

2.3.1. Sinaptofisina

A sinaptofisina é uma glicoproteína da membrana celular, identificada nas vesículas pré-sinápticas de neurônios e em células neuroendócrinas (WIEDENMANN *et al.*, 1986). Parte estrutural dos neuromônios, e provavelmente, um dos marcadores imunoistoquímicos mais utilizados, a sinaptofisina vem sendo considerada um marcador diagnóstico nos tumores neuroendócrinos, e dentre estes, o mais antigo em uso rotineiro em laboratórios assistenciais (ERICKSON e LLOYD, 2004).

Neste estudo, será decisivo para critérios diagnósticos e confirmatório como controle interno das reações.

2.3.2. Cromogranina A

Também chamada de secretogranina I, a Cromogranina é uma proteína também encontrada em neurônios e células neuroendócrinas, intimamente ligada ao processo de produção de catecolaminas. Nos primeiros estudos, sua expressão à imunoistoquímica foi considerada superponível à presença de catecolaminas no tecido analisado (WILSON e LLOYD, 1984).

Esta proteína é utilizada como marcador tumoral com utilidade em neoplasias endócrinas, como feocromocitomas, carcinóides, carcinoma medular da tiróide, adenoma

hipofisário, carcinoma de células da ilhota do pâncreas e na neoplasia endócrina múltipla. Existe ensaio sérico para a sua dosagem, e quando expressa por uma determinada neoplasia, torna-se útil no diagnóstico diferencial e detecção de recidivas (CAMPANA *et al.*, 2007).

2.3.3. Ki67

O Ki67 é uma proteína muito grande, com cerca de 395 kDa, que possui diversos sítios de ligação específicos. Marcador de fácil detecção, pode ser usado inclusive em tecidos submetidos a eletrocauterização.

Este marcador é um auxiliar extremamente importante para diagnóstico, como indicador prognóstico, e como ferramenta de pesquisa. Isso deve-se ao fato de corresponder a uma proteína que é expressa durante a fase G1 do ciclo celular. Assim, mesmo desconhecendo-se completamente sua exata função no ciclo celular, é possível correlacionar a sua expressão a células que estão em proliferação celular, sejam elas normais ou tumorais (BROWN e GATTER, 2002).

São numerosos os trabalhos que utilizam-se desta proteína investigando seu valor prognóstico e diagnóstico, inclusive para tumores neuroendócrinos (HELPAP e KOLLERMANN, 2001; FERRARI *et al.*, 2006; BOO *et al.*, 2007).

2.3.4. c- Kit

O c-kit é uma proteína transmembrânica, da família das tirosino-cinases, à qual se liga o fator de células-tronco (SCF), também conhecido como “*kit-ligand*”. Participa do mecanismo de diferenciação celular das células tronco hematopoiéticas, nos passos que as diferenciam em eritroblastos (ASHMAN, 1999).

Há um medicamento - o mesilato de imatinib - capaz de aproveitar-se de sua

característica transmembrânica, tratando especificamente as células neoplásicas. Inicialmente, esta droga foi desenvolvida como tratamento para a leucemia mielóide crônica, por meio do estudo de outra tirosinocinase, a ABL, mediada pelo gene BCR-ABL, intimamente relacionado à principal alteração gênica desta neoplasia.

Esta medicação foi também usada nos tumores estromais gastrointestinais, com impacto muito significativo de prognóstico dos doentes, justamente porque, aproveitando-se da semelhança morfofuncional entre os mediadores intracelulares c-kit e ABL, a medicação funciona também nessa neoplasia (HIROTA *et al.*, 1998; HEINRICH *et al.*, 2003; GOLD e DEMATTEO, 2006). A terapêutica combinada – cirurgia e imatinib – trouxe uma mudança significativa da história natural da doença (GOLD e DEMATTEO, 2006).

A imunistoquímica, cada vez mais abrangente e popular, demonstra a expressão destas proteínas em células de outros tecidos além dos hematopoiéticos, em especial aqueles de diferenciação neural. Assim, foi também identificada em tumores neurais ou fenotipicamente assemelhados – como os tumores estromais gastrointestinais, provavelmente devido a sua característica fenotípica similar à neural, pois supõe-se que sua origem é derivada das células constituintes do marcapasso cardíaco (HIROTA *et al.*, 1998).

O c-kit, portanto, tornou-se uma das moléculas mais importantes para o novo ramo emergente da patologia – a farmacopatologia – da qual podemos, através de um simples exame imunistoquímico, selecionar pacientes para tratamentos diversos. A experiência positiva no tratamento das leucemias e dos GISTs fez a demanda para a pesquisa deste marcador crescer, com vários autores identificando a expressão do c-kit em neoplasias diversas, como dentre outras, tumores pulmonares (HIROTA *et al.*, 1998; ARAKI *et al.*, 2003), testicular (REYES *et al.*, 2003), cutâneos (FEINMESSER *et al.*, 2004) e ovarianos (WILCZYNSKI *et al.*, 2005), sempre com a particularidade da co-expressão de marcadores neuroendócrinos. Já existem séries de casos estudados em tumores neuroendócrinos, que sugerem valor prognóstico positivo, além de sugerir protocolos terapêuticos para este subgrupo de tumores (KOSTOULA *et al.*, 2005; FERRARI *et al.*, 2006).

2.3.5. VEGF

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um hormônio de ação parácrina, expresso por células endoteliais quando da reparação tecidual por injúrias diversas. Entretanto, tal marcador é super-expresso em diversas neoplasias, e mostra-se sempre com importante valor prognóstico negativo, pois sua presença indica maior angiogênese, e portanto, preditivo de doença metastática. Na próstata, a relação foi previamente testada (HARPER *et al.*, 1996; BORRE *et al.*, 2000), sendo também percebida como provável em tumores fenotipicamente diversos, e de diferentes localizações, como estômago (ISHIKAWA *et al.*, 2003), cólon e reto (MAEDA *et al.*, 2003) e cavidade oral (SHINTANI *et al.*, 2004).

2.3.6. E - caderina

A E-caderina é uma proteína transmembrânica importante na coesividade tissular, estando presente nas membranas basolaterais das células da camada basal. Também é importante na ativação transcricional, pois ancora-se nas cateninas, moléculas pertencentes à sinalização de processos transcricionais, ligadas às vias de proliferação celular (LI *et al.*, 2002). Como fazem parte de uma via responsável pela arquitetura do citoesqueleto, a sua expressão anormal ou baixa expressão do complexo E-caderina/cateninas está ligada à desdiferenciação tumoral e conseqüentemente, a pior prognóstico (SALON *et al.*, 2004; PELOSI *et al.*, 2005).

2.3.7. 34βE12

O marcador 34βE12 é uma citoqueratina de alto peso molecular, normalmente expressa em diversas células epiteliais. Dentre as citoqueratinas, é uma das mais utilizadas em imunoistoquímica por sua sensibilidade e especificidade para evidenciar células normais, como as da camada basal prostática, e auxilia no diagnóstico diferencial do sítio primário de entre neoplasias epiteliais (FREEMAN *et al.*, 2002).

Um artigo científico em imunohistoquímica de tumores neuroendócrinos pulmonares definiu como inexistente a sua expressão em células de diferenciação neuroendócrina no pulmão, bem como em todo o espectro dos tumores a estas relacionadas (STURM *et al.*, 2003). Assim, é um provável controle negativo para os tumores neuroendócrinos, merecendo tal assertiva ser testada nos tumores de outras topografias.

2.3.8. p53

O p53 é uma proteína chave na supressão da carcinogênese, pois é um mediador pró-apoptótico, ativado quando há dano ao DNA celular severo, induzindo à morte celular (AYLON e OREN, 2007). Protegendo a proliferação de células com danos ao DNA, o gene que a codifica é considerado um gene de supressão tumoral. Porém, este está mutado em cerca de 60% das neoplasias malignas. Nestas é possível detectar a expressão da forma mutada da proteína p53. Considerado um fator adverso de prognóstico em muitas neoplasias, tornou-se assim dos prováveis alvos para as terapias gênicas a serem desenvolvidas (PAPAVASSILIOU, 2000).

2.3.9. CD99

O CD99 é uma proteína transmembrânica expressa em numerosos tipos de células da linhagem hematopoiética. Está relacionada ao mecanismo de migração monocitária através dos endoteliócitos (SCHENKEL *et al.*, 2002). Independentemente de sua função, é encontrada hiperexpressa em células de neoplasias neuroectodérmicas primitivas, como no tumor neuroectodérmico primitivo propriamente dito, no sarcoma de Ewing e no tumor de Askin. Nestes tumores, anticorpos anti-CD99 estão sendo empregados em ensaios pré-clínicos para tratamento adjuvante, com resultados promissores (SCOTLANDI *et al.*, 2000).

Por ser um marcador de membrana de excelente visualização nestes tumores, e alvo terapêutico, foi testada a sua positividade nos prevalentes tumores neuroendócrinos

gastrointestinais e pulmonares. A expressão deste marcador parece ser um fator preditivo independente de risco de metástase neste grupo de neoplasias, pois é expresso em neoplasias neuroendócrinas de baixo grau, sendo menos encontrado naquelas mais agressivas (PELOSI *et al.*, 2000; PELOSI *et al.*, 2006). Assim, sugere-se que justamente as neoplasias menos agressivas podem ser alvo da terapêutica usada nos tumores neuroectodérmicos primitivos.

2.3.10. S-100

As proteínas S-100 fazem parte de uma família de proteínas ácidas que se ligam ao cálcio. Por estarem intimamente ligadas ao metabolismo intracelular do cálcio, as proteínas S-100 têm múltiplas funções, a depender da célula na qual se encontra e do subtipo da proteína.

São expressas em um amplo espectro celular, de células inflamatórias a células de histogênese neuroepitelial. Exemplificam-se, dentre outras, os macrófagos e neutrófilos, astrócitos, melanócitos, ceratinócitos, células perineuriais e células neuroendócrinas. Expressa-se também tumores presumidamente destes originados, como em carcinomas basocelulares, condromas, cordomas e paracordomas, neoplasias anexiais da pele, tumores malignos e benignos da bainha de nervos periféricos, e no melanoma (MCNUTT, 1998).

Apesar disso, são poucos os trabalhos correlacionando a expressão desta proteína à neoplasias neuroendócrinas. Nestes, a expressão parece estar associada não às células proliferadas, mas em células que formam o seu arcabouço (DELELLIS e OSAMURA, 2006; OSAMURA *et al.*, 2006).

OBJETIVO DO ESTUDO

3. OBJETIVO DO ESTUDO

O presente estudo tem como objetivo verificar a frequência da expressão dos marcadores Sinaptofisina, Cromogranina, Ki67, p53, c- kit, VEGF, e- caderina, 34 β E12, CD99 e S100, por escores em dois e quatro níveis.

As diferenças de frequências serão correlacionadas às diferenças entre os grupos conforme as variáveis idade, sexo, topografia das lesões, e classificação histológica dos tumores.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo é retrospectivo, de casos seqüenciais em diversos laboratórios localizados em Brasília – DF, públicos e privados, a seguir:

- Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília.
- Micra Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia LTDA.
- Laboratório de Imunopatologia de Brasília / Biópsia

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Os custos foram patrocinados pelo Laboratório de Imunopatologia de Brasília.

4.1. Critério de inclusão

Diagnóstico histopatológico de neoplasia neuroendócrina, em peças cirúrgicas, conforme critérios vigente da OMS, no período de 1997 a 2006.

4.2. Critérios de exclusão

Discordância diagnóstica na revisão de laudo.

Material insuficiente para reação imunoistoquímica e/ou bloco de parafina inadequado para cortes histológicos.

Impossibilidade de reaver o bloco de parafina do caso selecionado, por recusa do paciente ou retirada prévia do mesmo do laboratório participante.

4.3. Confirmação diagnóstica

Foram revistas pelo pesquisador as lâminas histopatológicas originais cedidas pelos laboratórios participantes do estudo, ou raramente em novos cortes caso necessário, como quebra de lâminas ou perda de definição da sua coloração. O padrão de trabalho dos três laboratórios é muito similar, com cortes histológicos de 4 μm , e coloração de rotina pelo método de Hematoxilina e Eosina. Eventuais colorações especiais para diagnóstico diferencial, como PAS, e Giemsa também foram examinadas. Tratam-se de colorações às quais as células neuroendócrinas e os tumores de fenótipo neuroendócrino não apresentam peculiaridades tintoriais (DELELLIS e DAYA, 1997).

Os critérios utilizados para a classificação correspondem aos da OMS (SOLCIA *et al.*, 2000). Utilizou-se, também, de uma classificação em dois estratos – benigno e maligno - conforme as ponderações de reprodutibilidade desta classificação no trabalho de Travis e colaboradores (TRAVIS *et al.*, 1998). Este critério foi utilizado em uma tese de doutoramento (PEREIRA, 2004), porém restrito à topografia broncopulmonar, e está expresso na tabela 2.

Tabela 2 - Critérios histopatológicos de classificação dos carcinomas neuroendócrinos, conforme a OMS

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

^a (apenas em topografia pulmonar)

Adaptado de (TRAVIS *et al.*, 1998; SOLCIA *et al.*, 2000)

Nesta fase, foram escolhidos os blocos para as reações, sendo preferidos aqueles com maior volume tumoral amostrado, um bloco por tumor, dos quais foram realizados cortes

histológicos de 4 μm , estes submetidos aos ensaios imunohistoquímicos.

4.4. Exame imunohistoquímico

Os fragmentos obtidos dos blocos de parafina foram colocados sobre lâminas de vidro previamente preparadas poli-L Lisina 0,1% (Sigma Diagnostics, EUA). Assim, assegura-se que os fragmentos cortados ao micrótomo se fixem firmemente à lâmina, evitando perdas durante a incubação antigênica.

Após receberem os fragmentos microtomizados, as lâminas foram desparafinizadas com três banhos de xilol, por 5 minutos cada, seguida por hidratação por submersão em álcool etílico absoluto com 3 banhos de 5 minutos, álcool 95% um banho de dois minutos, e depois em água destilada e deionizada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (Vetec, Brasil), por 17 minutos. Segue-se de lavagem em água destilada, sucedida por incubação em tampão citrato (Sigma Diagnostics, EUA), pH=6.2 e aquecimento a uma temperatura de 120°C sob pressão, para exposição antigênica, por 1 minuto e 30 segundos.

Após a exposição antigênica, as lâminas permaneceram no tampão citrato por 30 minutos, em banho Maria a temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram incubadas com soro de leite desnatado a 3% em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2 a 7,4 (PBS) por 30 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. As lâminas foram então secas e incubadas com os anticorpos primários, por 18 horas e mantidas na temperatura de 4 °C. Os anticorpos que foram utilizados e suas respectivas diluições estão especificados na Tabela 3. Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. Todos os anticorpos são provenientes do laboratório Dako Denmark A/S, divisão dako Cytomation, sediado na Dinamarca.

Tabela 3 – Relação de marcadores utilizados, diluições e seus respectivos clones

Marcador	Clone	Diluição
Sinaptofisina	policlonal	1:100
Cromogranina	policlonal	1:100
Citoqueratina de alto peso molecular	34βE12	1:100
S100	policlonal	1:300
Ki67	MIB-1	1:75
p53	DO-7	1:100
VEGF	AB-3	1:400
CD99	12E7	1:100
CD117 (c-kit)	104D2	1:100
E-caderina	NCH38	1:100

Após o período de 18 horas, realizaram-se as lavagens consecutivas e posteriormente a incubação com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho/camundongo/cabra por 20 minutos, à temperatura de 22 a 25 °C, seguido pela incubação da streptoavidina marcada com peroxidase por 20 minutos, à temperatura ambiente (kit DAKO LSAB+, Peroxidase- Universal- K0690, Dako Cytomation).

Posteriormente às lavagens consecutivas com PBS-BSA a 1%, procedeu-se à revelação da reação utilizando o substrato 3.3-Diaminobenzidina pronto para uso (KIT DAKO, Dako Cytomation). A revelação foi feita, por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Mayer (Merck, Germany) por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Novamente lavadas com água destilada por mais duas vezes, as lâminas foram incubadas por mais 10 minutos em água destilada, desidratadas com álcoois (95° e 100° GL), clarificadas em xilol (3 vezes) e montadas com solução de resina não aquosa (Mikroskopie Entellan, Merck, Germany).

Para controle positivo, utilizaram-se cortes de carcinoma neuroendócrino de pulmão, sabidamente positivo para Sinaptofisina, cromogranina, Ki-67, e VEGF; este também continha brônquio preservado, sabidamente positivo para E-caderina e 34BE12; e um tumor gastrointestinal estromal para o marcador c-kit. Para controle negativo, os cortes foram incubados com BSA, sem adição de anticorpo.

4.5. Leitura das lâminas

Todos os cortes histológicos foram examinados, usando-se os sistemas pré-definidos de graduação. A reatividade nuclear, de membrana e/ou citoplasmática foram classificadas semiquantitativamente numa escala de 0 a 4, conforme os critérios de Sanino e Shousha, padronização sugerida pelo Manual de Imunoistoquímica, uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Patologia, conforme tabela 4:

Tabela 4 - Intensidade de coloração à Imunoistoquímica, conforme a SBP.

<i>Escore</i>	<i>Características</i>
0	ausência de coloração
1	células ocasionais e/ou coloração fraca
2	moderada ou forte em até 1/3 das células
3	moderada ou forte entre 1/3 e 2/3 das células, ou moderada mais de 2/3 e forte em até 1/3 da células
4	forte em mais de 2/3 das células

Fonte: SANINO e SHOUSA apud (ALVES *et al.*, 1999)

A leitura é sempre orientada às células tumorais, e para cada marcador, observou-se o padrão de expressão imunoistoquímica conforme a topografia intracelular esperada.

Para a fins de testes estatísticos, em pequenas amostras, também se utilizou de um escore em dois níveis, agrupando os escores 0 e 1 como negativos, e 2, 3, e 4 como positivos. Este escore ilustra casos onde há imediata identificação da imunomarcção contra aqueles onde esta é nula, ou de difícil averiguação.

4.6. Análise estatística

Dada a natureza das variáveis em estudo, que são predominantemente ordinais e semi-quantitativas, com algumas variáveis qualitativas, os dados obtidos foram analisados pelos métodos do Qui-quadrado de Pearson para frequências. Em tabelas 2 x 2 de variáveis qualitativas, utilizou-se o teste exato de Fisher.

Quando necessário comparar médias de idade usou-se ainda o teste t de Student e o

teste ANOVA. Por tratarem-se de fenômenos biológicos, considerou-se como significativo quando o valor de p fosse menor que 0,05, para todos os testes estatísticos realizados. A ferramenta estatística utilizada foi o *SPSS versão 13* (SPSS Inc, Illinois, EUA).

4.7. Adequação às normas

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas técnicas em vigor da ABNT – NBR 6023/2002 e ABNT – NBR 10520/2002. As abreviaturas de títulos e periódicos foram indexadas conforme o *Index Medicus*, listagem acessada no sítio da Organização Mundial da Saúde, em setembro de 2007.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Da amostragem

Foram selecionados 20 casos não seqüenciais dos 43 casos levantados nos laboratórios participantes. Os casos não aproveitados foram excluídos conforme os critérios previamente referidos, sendo a inadequação dos blocos de parafina para cortes histológicos seriados o critério mais prevalente de exclusão, seguida da impossibilidade de classificar a lesão conforme a OMS por falta de dados clínicos e/ou morfológicos.

A tabela 5 mostra os casos individualizados, com a neoplasia correspondente, sexo e idade.

Tabela 5 - Casos selecionados para estudo, conforme laboratório de origem, idade, sexo e doença

<i>Identificação</i>	<i>Origem</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Neoplasia</i>
02/1415	HUB	74	F	CN cólon
65133	LIB/Biópsia	51	M	CN cólon
38/06	HUB	48	M	CN cólon metastático fígado
61651	LIB/Biópsia	73	M	CN intestino delgado
2123/01	HUB	74	F	CN Reto
60993	LIB/Biópsia	44	F	CN reto
65995	LIB/Biópsia	61	F	CN de fígado
05/7107	Micra	52	M	Carcinóide brônquico
04/8843	Micra	60	F	Carcinóide brônquico
05/7007	Micra	52	M	Carcinóide de pulmão
3119/02	HUB	53	F	CN pulmão
2251/01	HUB	67	F	CA pequenas células do pulmão
02/3470	Micra	58	M	CA pequenas células do pulmão
2133/02	HUB	32	F	CA medular tireóide
1083/01	HUB	50	F	Ca medular de tireóide
65942	LIB/Biópsia	61	M	Paraganglioma
1276/06	HUB	57	F	Paraganglioma
1416/99	HUB	50	F	CN em linfonodo
61521	LIB/Biópsia	90	M	CN em linfonodo
00/6644	Micra	70	F	CN colo uterino

CA = carcinoma; CN = carcinoma neuroendócrino

A média de idade dos casos selecionados foi de 59,20 anos, com mediana em 57,50

anos, e desvio padrão de 12,903 anos. A distribuição das idades averiguadas acompanha uma curva normal.

As freqüências de sexo e idade dos casos selecionados estão expressos conforme a figura 3:

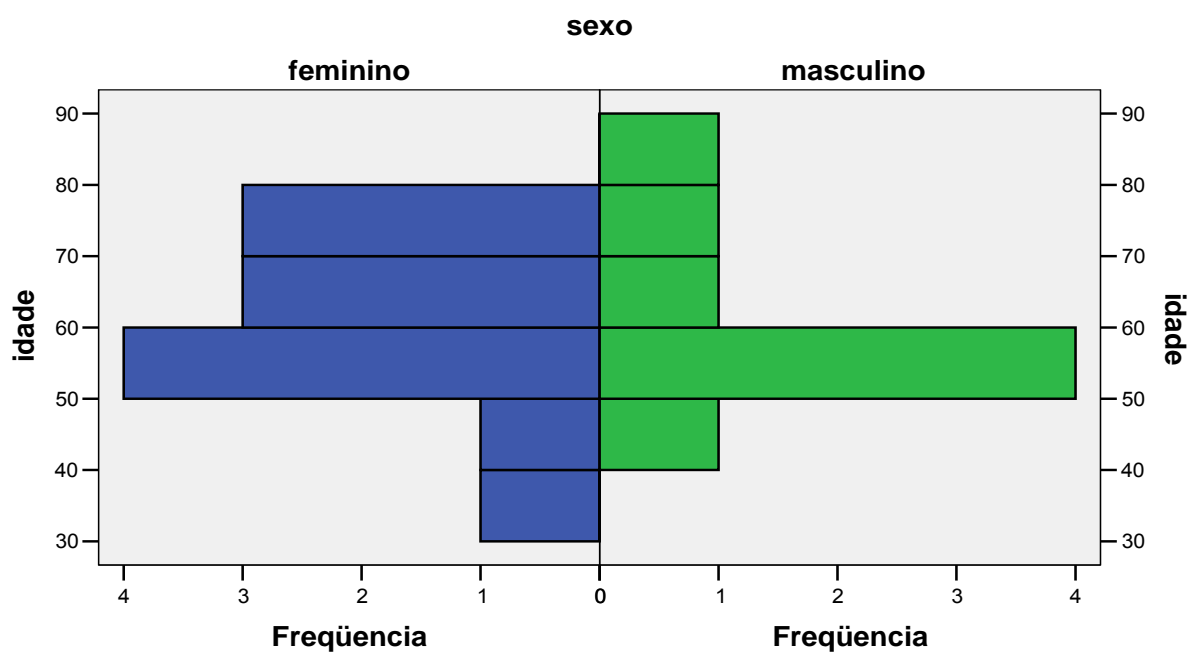


Figura 3 - Freqüências em faixas de idade conforme o sexo

A freqüência dos casos conforme a classificação dos tumores neuroendócrinos da OMS e a classificação em dois estratos, referidas nos métodos deste texto estão expressas nas figuras 4 e 5:

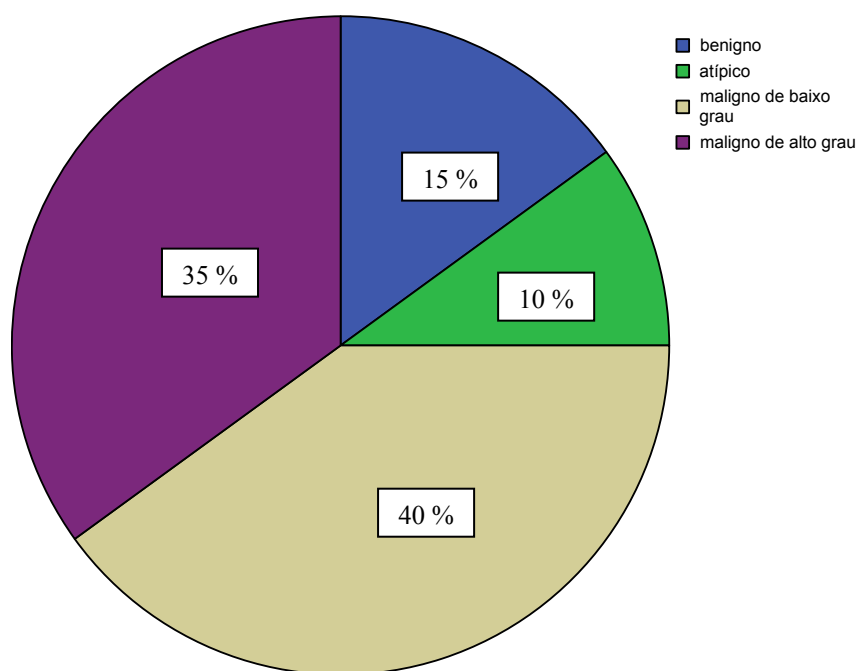


Figura 4 - Frequências percentuais dos tumores conforme a classificação da OMS

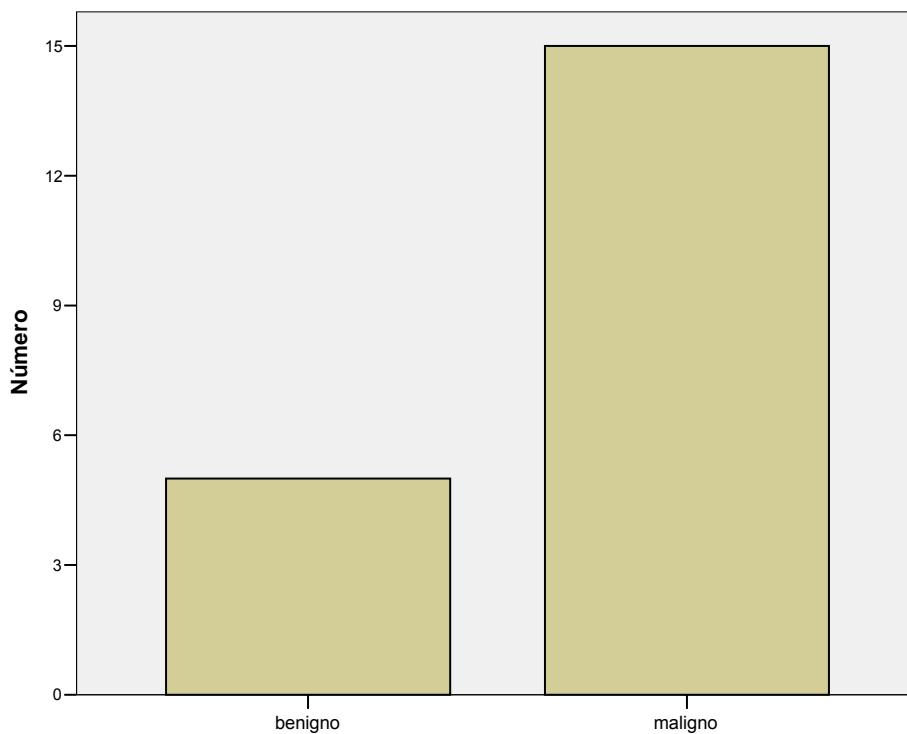


Figura 5 - Frequências dos tumores conforme a classificação em dois estratos

As médias de idade não apresentam diferenças significativas quando tabuladas para os grupos de neoplasias, nas classificações em 2 ou 4 níveis. Os valores do teste do Qui quadrado mostram p de 0,299 e 0,338, respectivamente para o teste da idade para as classificações de 2 e 4 níveis.

Para sexo, o valor do p no teste Qui quadrado para os 4 níveis foi de 0,280. Na classificação em 2 níveis, utilizou-se o teste exato de Fisher por se tratar de uma tabela 2 x 2. Este também não caracterizou diferenças significativas, com p de 0,693.

Quanto à localização, os tumores foram agrupados, como mostrado na figura 6:

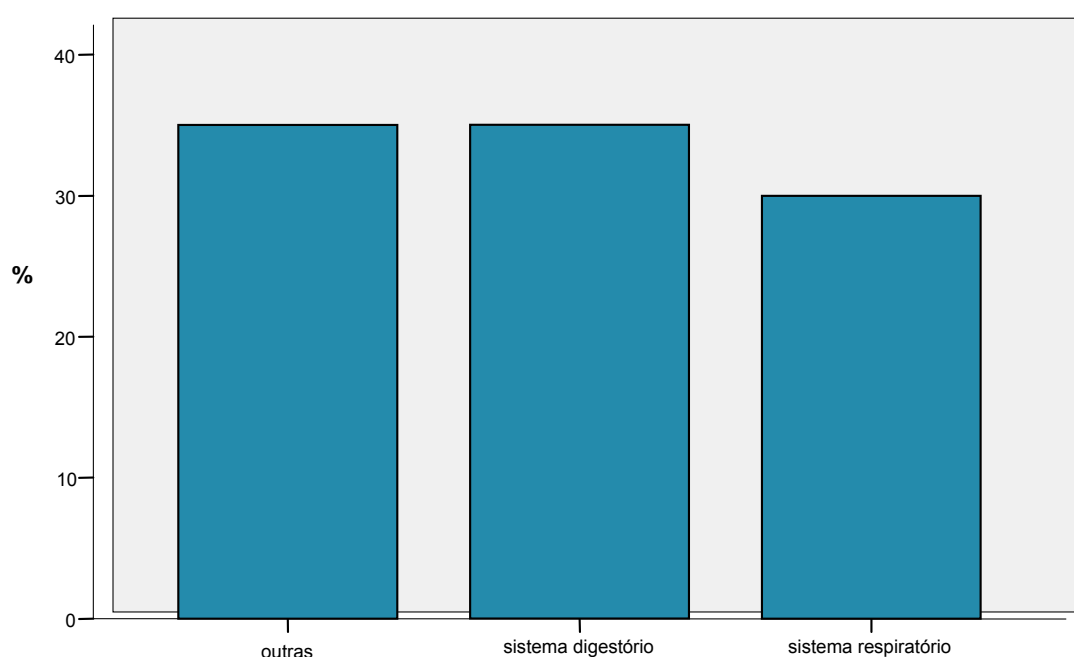


Figura 6 – Frequências percentuais conforme a localização topográfica tumoral

Também não houve diferenças significativas no teste do Qui quadrado quando estas frequências foram tabuladas com idade ($p = 0,173$), sexo ($p = 0,721$) e classificação tumoral ($p = 0,240$ para 2 níveis e $0,112$ para 4 níveis).

5.2. Dos marcadores

A figura 7 sumariza as freqüências das expressões imunoistoquímicas para os marcadores testados, quando considerada a estratificação em dois níveis, divididas conforme o escore maior que 1:

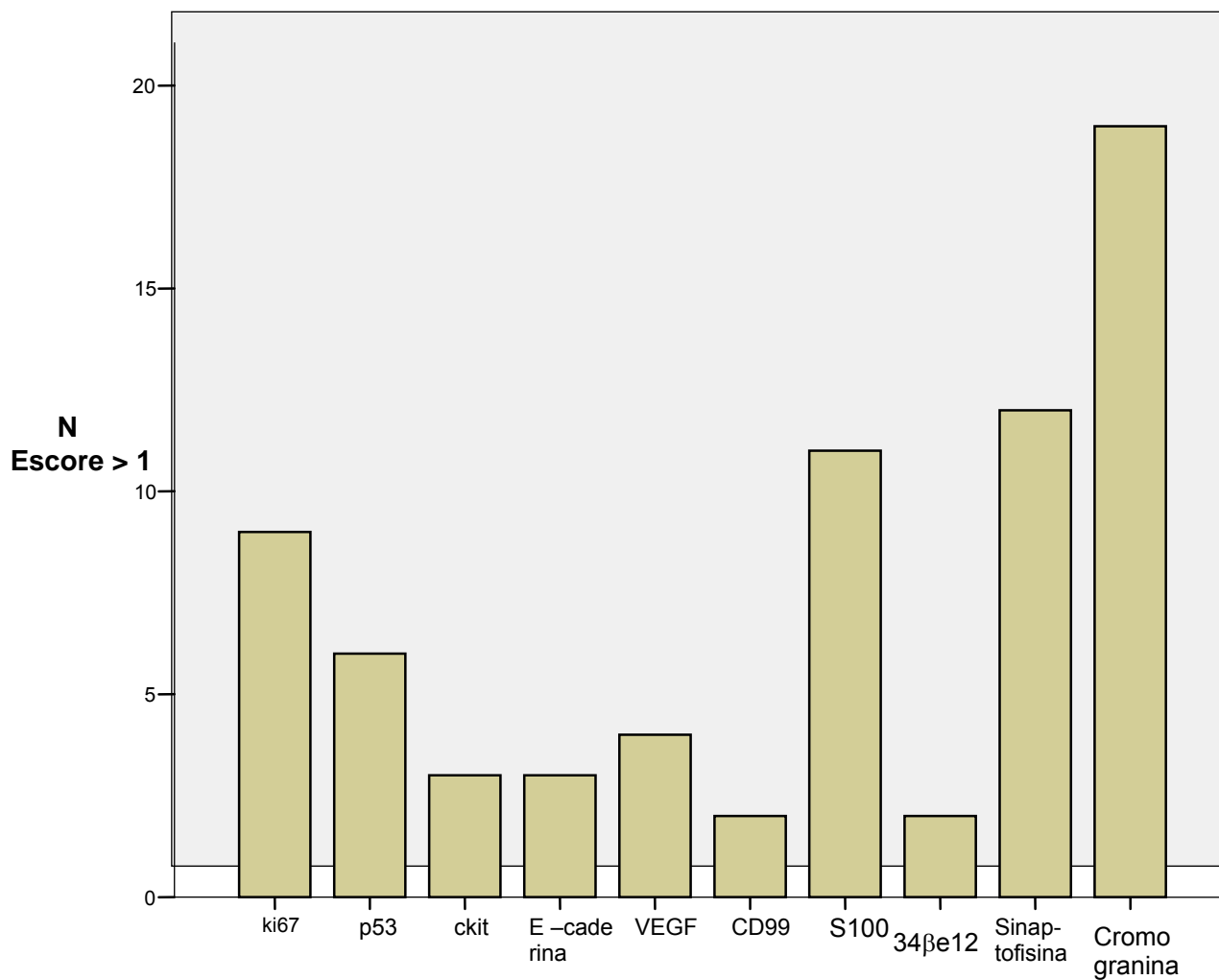


Figura 7 - Freqüências de positividade da reação para os diferentes marcadores

A sinaptofisina teve freqüente marcação positiva, de padrão citoplasmático, conforme exemplo na figura 8.

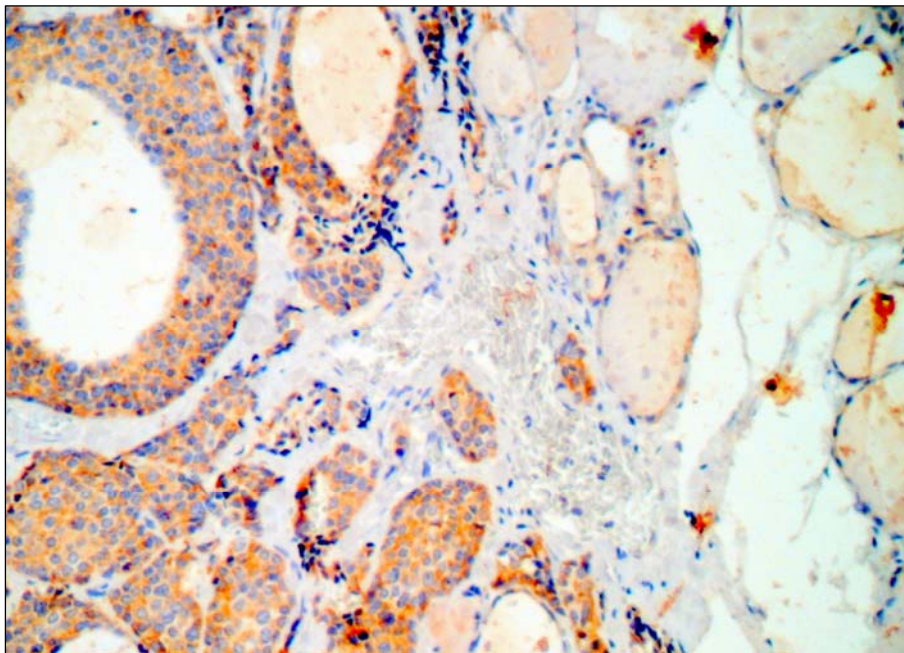


Figura 8 - Carcinoma medular de Tireóide. Imunomarcção score 4, padrão citoplasmático. Marcador sinaptofisina, objetiva de 10x.

O marcador cromogranina teve igualmente marcação citoplasmática, universalmente presente, e apenas um caso fracamente marcado. Está ilustrado na figura 9.

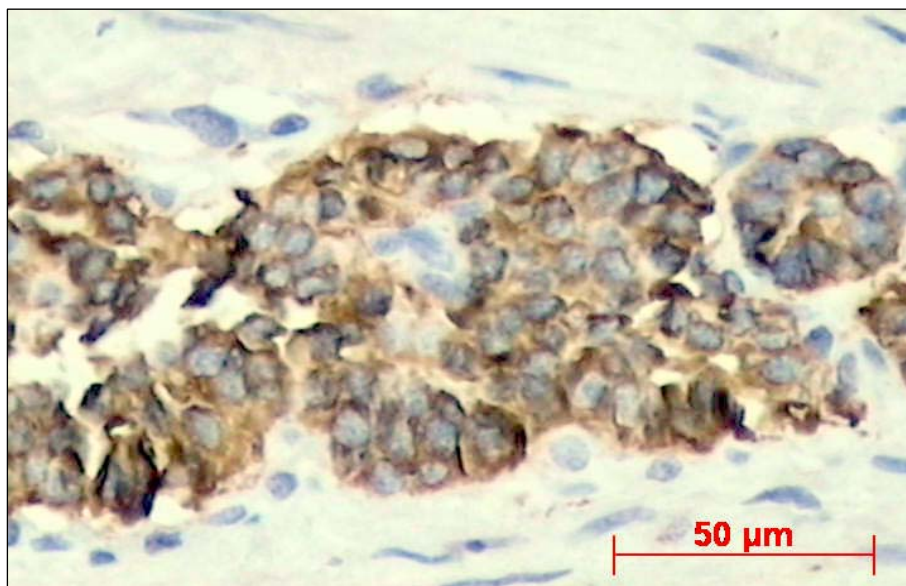


Figura 9 - Carcinóide brônquico. Imunomarcção Escore 4. Marcador cromogranina, Objetiva de 40x.

O marcador S100 teve marcação positiva em diversos tumores dos testados, conforme exemplificado na figura 10.

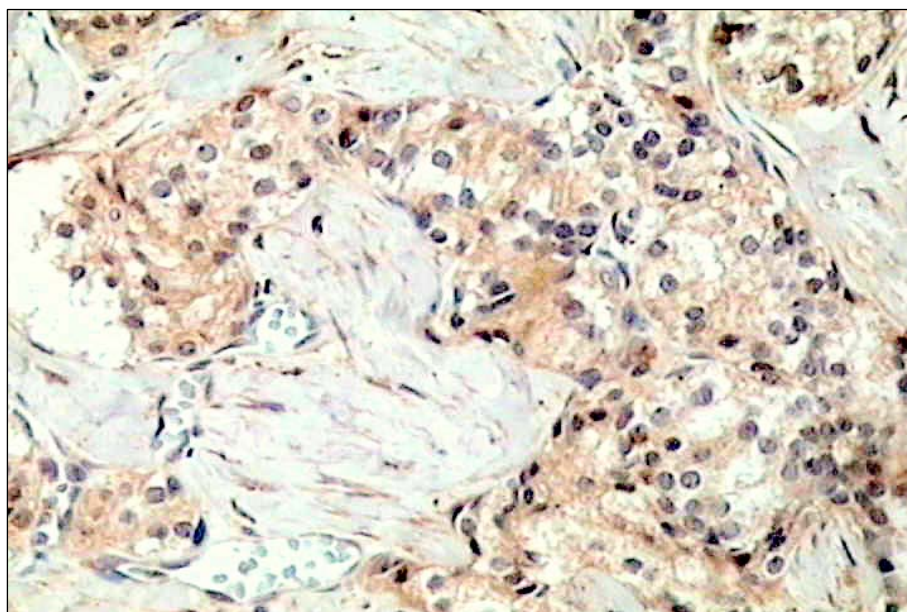


Figura 10 - Paraganglioma. Marcação escore 3. Notar positividade em células do arcabouço estromal. Marcador S100, objetiva de 20x.

A marcação para citoqueratinas de alto peso molecular foi positiva em apenas dois casos. O padrão mais comum foi a positividade apenas em vários tecidos não tumorais amostrados, e não nas células tumorais, conforme exemplificado na figura 11.

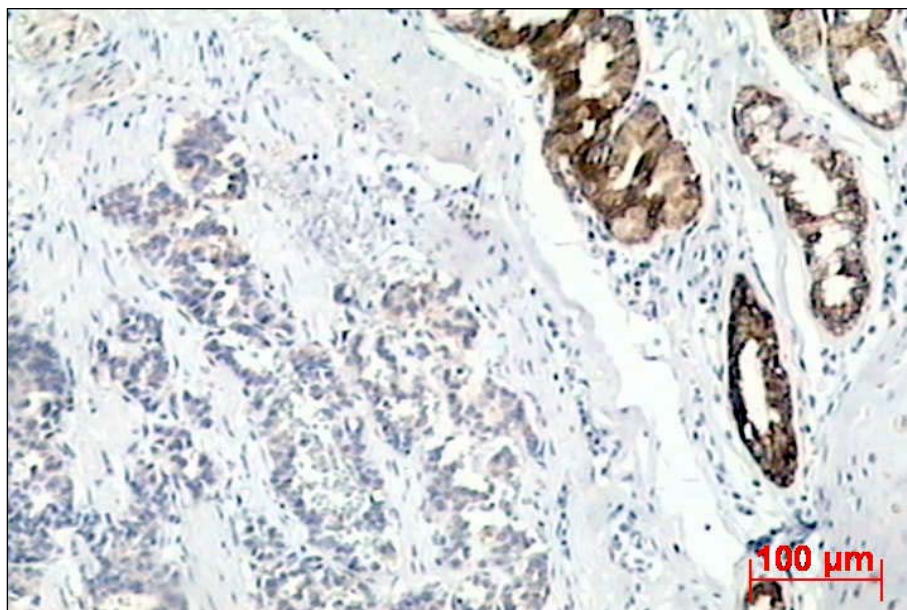


Figura 11 - Carcinóide brônquico. imunomarcção escore 0. Notar o controle interno fortemente positivo em glândulas adjacentes à lesão. Marcador 34βe12, objetiva de 10x.

O marcador ki-67 teve marcações variáveis nos diversos tumores testados, sendo negativo em alguns destes. A exemplo, mostra-se um escore 3, de um tumor retal, na figura 12.

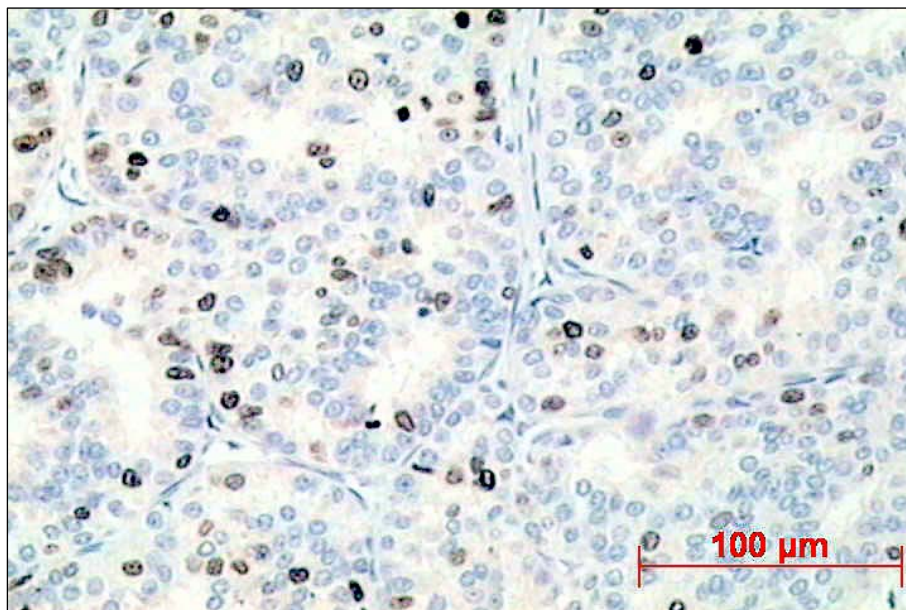


Figura 12 - Carcinoma neuroendócrino do reto. Imunomarcacão escore 3. Marcador ki67, objetiva de 20x.

O marcador p53 obteve marcações positivas em seis dos 20 tumores testados. Na figura 13, entretanto, está exemplificado um caso de escore 1, com marcação de uma célula isolada.

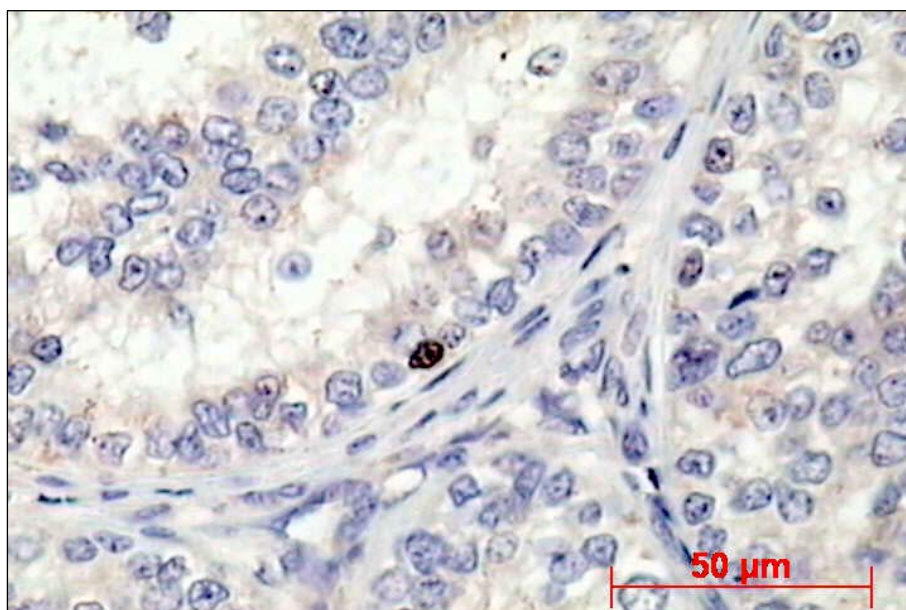


Figura 13 - Carcinoma neuroendócrino de pulmão. Imunomarcacão escore 1. marcador p53, objetiva de 40x

Os demais marcadores estão exemplificados nas figuras 14, 15, 16 e 17. Estão presentes em pequenos subgrupos dos tumores examinados. Não houve marcador universalmente negativo aos protocolos de imunohistoquímica.

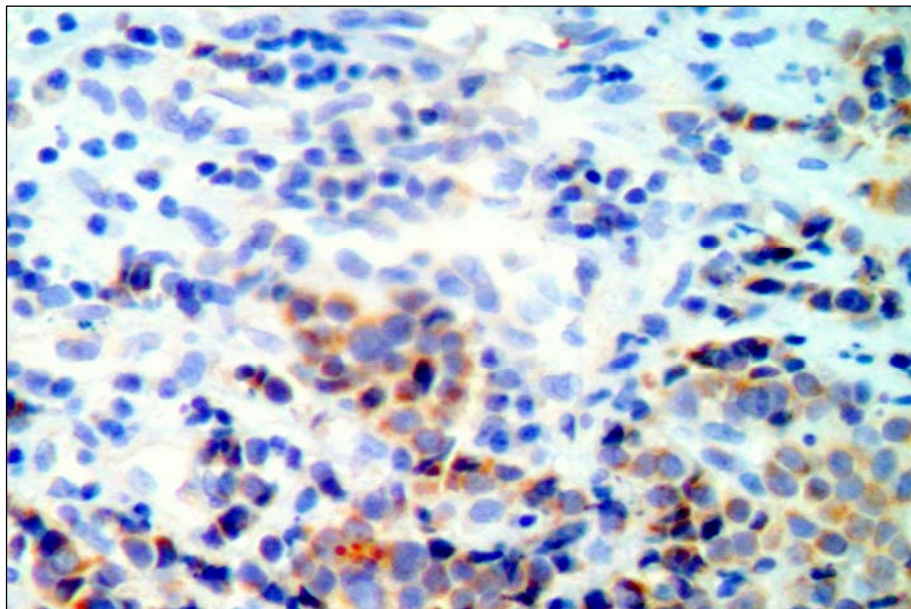


Figura 14 - Carcinoma neuroendócrino brônquico. Imunomarcação escore 2. Marcador VEGF, objetiva de 20x. Observar a negatividade em células inflamatórias.

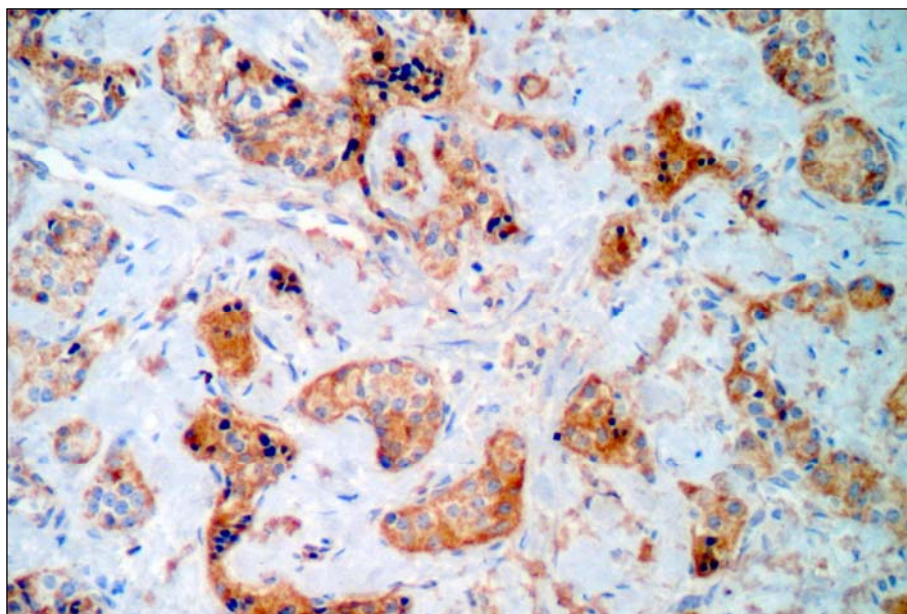


Figura 15 - Paraganglioma. Imunomarcação escore 3. Marcador E-caderina, objetiva de 40x.

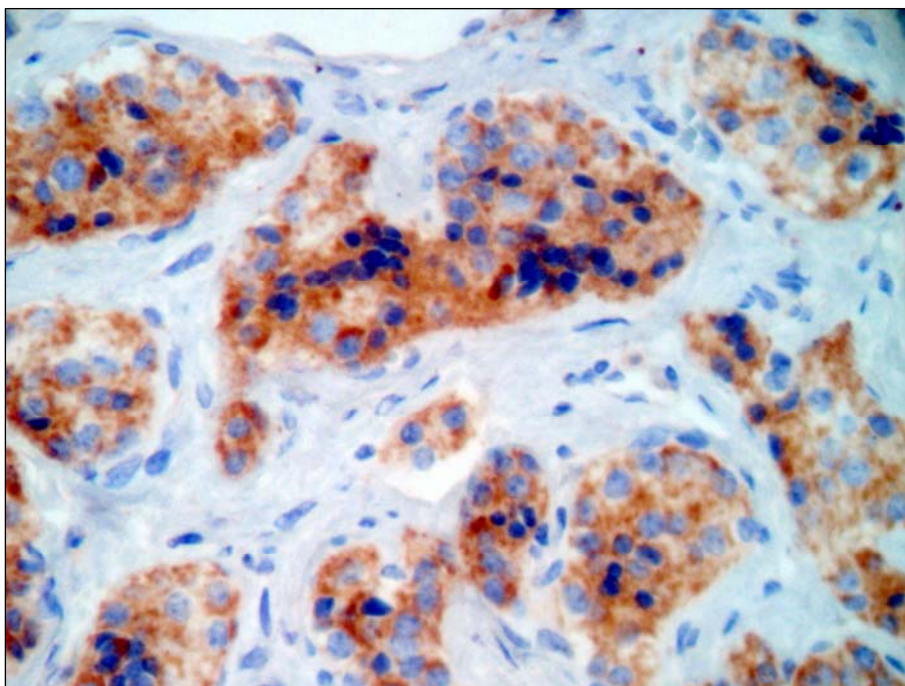


Figura 16 – Carcinoma medular de tireóide. Imunomarcação escore 3. Marcador c-kit, objetiva de 20x.

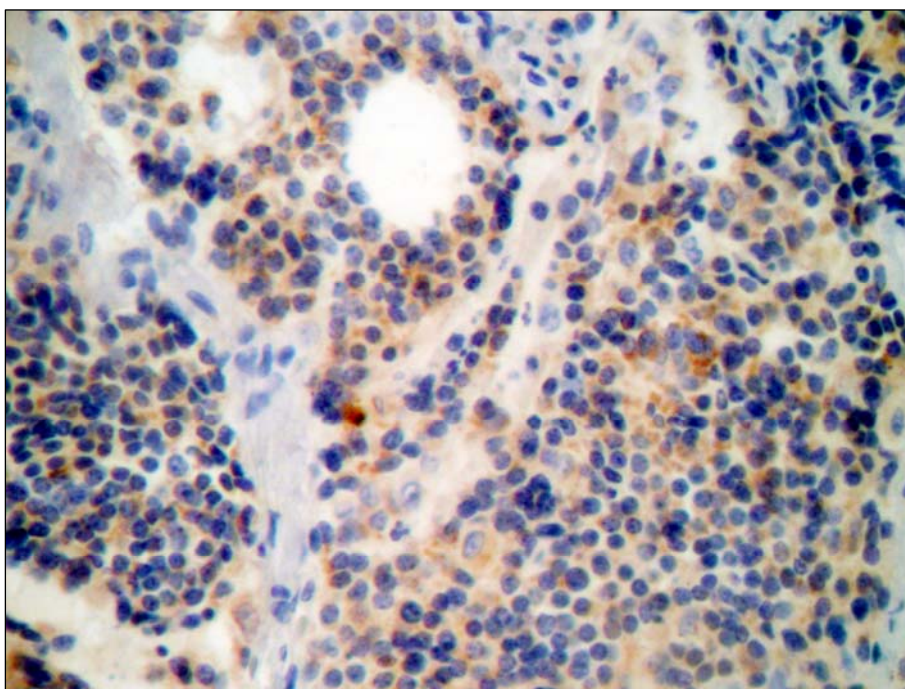


Figura 17 - Carcinoma de pequenas células do pulmão. Imunomarcação escore 2. Marcador CD99, objetiva de 20x

5.3. Da correlação entre marcadores e demais variáveis

5.3.1. Testes estatísticos paramétricos

A única variável escalar é a idade, e portanto, a única variável elegível para testes paramétricos. Para o presente estudo, o teste t de student é o mais adequado, e pode ser aplicado para comparar médias de dois grupos mesmo em amostras pequenas. Foi aplicado para cada marcador, e quando utilizou-se os escores em dois níveis. O padrão de distribuição consistentemente positivo para a Cromogranina impediu o cálculo estatístico nesta análise. Nenhum dos marcadores obteve resultado estatisticamente significativo.

O teste ANOVA é também adequado para comparar as médias, em grupos diversos. Foi aplicado para averiguar diferenças nas médias de idade quando os pacientes são agrupados conforme os escores em quatro níveis, marcador a marcador. Igualmente, não houve nenhum marcador estatisticamente significativo.

A tabela 6 apresenta o valor de p para os testes acima descritos.

Tabela 6 - Valor de p para os testes paramétricos, das médias de idade em grupos conforme escores dos marcadores

	<i>Teste t de Student (escores em dois níveis)</i>	<i>ANOVA (para escores em quatro níveis)</i>
p53	0,820	0,991
Ki67	0,508	0,713
Ckit	0,066	0,063
E-caderina	0,128	0,081
VEGF	0,668	0,596
CD99	0,205	0,308
S100	0,643	0,897
34bE12	0,188	0,191
Sinaptofisina	0,250	0,130
Cromogranina	n/a	0,575

5.3.2. Testes estatísticos não paramétricos

As demais variáveis são nominais e ordinais, e portanto podem ser submetidas aos

teste do Qui-quadrado, que atesta a diferença significativa nas frequências entre grupos. As diversas variáveis de estudo foram tabuladas para cada um dos marcadores.

A tabela 7 mostra os valores de p, conforme o escore da imunomarcção, considerando as variáveis de estudo, e os níveis de escore utilizados. Em destaque, os valores estatisticamente significativos.

Tabela 7 - Valores de p para o teste do Qui-quadrado (Pearson), entre as variáveis qualitativas de estudo e marcadores.

	<i>Sexo</i>		<i>Localização</i>		<i>Tumor</i>	
	2 níveis	4 níveis	2 níveis	4 níveis	2 níveis	4 níveis
c-Kit	0,798	0,684	0,355	0,554	0,230	0,380
E-caderina	0,125	0,308	0,038	0,161	0,230	0,380
VEGF	0,469	0,660	0,776	0,831	0,597	0,671
CD99	0,761	0,470	0,544	0,603	0,178	0,286
S100	0,714	0,634	0,121	0,251	0,092	0,176
34bE12	0,224	0,502	0,621	0,436	0,178	0,175
Sinaptofisina	0,456	0,430	0,850	0,363	0,837	0,655
Cromogranina	0,402	0,125	0,374	0,759	0,664	0,706
Ki67	0,199	0,344	0,249	0,406	0,396	0,050
P53	0,690	0,544	0,587	0,417	0,596	0,610

Estão reproduzidas nas tabelas 8 e 9 as tabulações estatisticamente significativas, extraídas das tabelas de cálculo do software utilizado. Na tabela 8, nota-se a ausência de escore maior que 1 nos tumores localizados nos tratos digestório e respiratório.

Tabela 8 - Frequência dos Escores da e-Caderina em dois níveis conforme localização do tumor. p = 0,038

		<i>Localização</i>			<i>Total</i>
		<i>outras</i>	<i>Sistema digestório</i>	<i>sistema respiratório</i>	
e- caderina	Escore 0 ou 1	4	7	6	17
	Escore > 1	3	0	0	3
	Total	7	7	6	20

Na tabela 9, destaca-se a concentração de casos negativos nos tumores benignos.

Tabela 9 - Frequência de Escores do marcador ki67 conforme classificação da OMS. p = 0,050

		Tumor				Total
		benigno	atípico	maligno de baixo grau	maligno de alto grau	
ki67	Negativo	3	1	0	0	4
	células ocasionais	0	0	4	3	7
	até 1/3 células	0	0	2	3	5
	até 2/3 moderado ou forte	0	0	2	1	3
	intenso	0	1	0	0	1
Total		3	2	8	7	20

A variável tumor foi também estratificada em 2 níveis – benigno e maligno, e também foi aplicado o teste de Qui-quadrado correlacionando esta classificação a cada um dos marcadores, obtendo os valores de p na tabela 10.

Tabela 10 - Valores de p para o teste do Qui-quadrado (Pearson), para a variável benignidade/malignidade de tumores e reatividade a marcadores

<i>Marcadores conforme escores</i>	<i>2 níveis</i>	<i>4 níveis</i>
c-Kit	0,718	0,601
E-caderina	0,718	0,601
VEGF	0,197	0,217
CD99	0,389	0,435
S100	0,069	0,140
34bE12	0,389	0,297
Sinaptofisina	1,000	0,935
Cromogranina	0,554	0,553
Ki67	0,191	0,0004
P53	0,573	0,440

A tabela 11 mostra as frequências consideradas para o cálculo das únicas diferenças estatisticamente significativas, que são as diferenças entre a frequência de positividade entre os escores em quatro níveis, para os tumores agrupados em malignos ou benignos.

Tabela 11 - Frequências de escores para ki67 conforme benignidade/malignidade dos tumores. $p = 0,004$.

		Tumor		Total
		benigno	maligno	
ki67	Negativo	4	0	4
	células ocasionais	0	7	7
	até 1/3 células	0	5	5
	até 2/3 moderado ou forte	0	3	3
	forte em + de 2/3	1	0	1
Total		5	15	20

A variável localização foi recodificada para detectar correlações da topografia dos tumores e frequência da expressão dos marcadores. Geraram-se duas novas variáveis – topografia no sistema respiratório, e topografia no sistema digestório – cada qual dando origem a dois grupos distintos. A diferença na frequência da imunexpressão dos marcadores entre estes grupos foi então testada, e os valores de p estão expressos conforme a tabela 12.

Tabela 12 - Valores de p para o teste do Qui-quadrado (Pearson), para as variáveis topográficas recodificadas e marcadores

<i>Marcadores conforme Escores</i>	<i>Trato digestório</i>		<i>Trato respiratório</i>	
	2 níveis	4 níveis	2 níveis	4 níveis
c-Kit	0,948	0,692	0,219	0,469
E-caderina	0,168	0,387	0,219	0,469
VEGF	0,482	0,426	0,807	0,907
CD99	0,274	0,260	0,423	0,621
S100	0,043	0,063	0,201	0,381
34bE12	0,639	0,402	0,329	0,679
Sinaptofisina	0,035	0,209	0,690	0,578
Cromogranina	0,162	0,510	0,502	0,840
Ki67	0,423	0,372	0,095	0,213
P53	0,357	0,337	0,394	0,319

Seguem-se as tabulações das frequências destes grupos conforme os marcadores cujo teste do Qui-quadrado atestou valor de p significativo. Na tabela 13, destaca-se a menor frequência de marcação para S100 no trato digestório, enquanto nas localizações extra-digestórias apenas um caso foi negativo.

Tabela 13 - Frequência de escores do marcador S100 em dois níveis, conforme a localização trato digestório. $p=0,035$.

	S100		Total
	Escore 0 ou 1	Escore > 1	
Digestório não	8	5	13
sim	1	6	7
Total	9	11	20

A Tabela 14 mostra que mesmo quando utilizada a tabela de escores em quatro níveis da SBP (ALVES *et al.*, 1999), as diferenças entre os grupos de tumores localizados no trato digestório e extra-digestório se diluem, com p não significativo.

Tabela 14 - Frequência de escores do marcador S100 em quatro níveis, conforme a localização trato digestório. $p = 0,063$.

	S100				Total
	Negativo	até 1/3 células	até 2/3 moderado ou forte	Intenso	
Digestório Não	8	1	2	2	13
Sim	1	2	0	4	7
Total	9	3	2	6	20

O marcador sinaptofisina, quando separando os tumores pelos mesmos grupos digestório e extradigestório, teve diferenças de frequência apenas quando os resultados da imunomarcacão para a sinaptofisina foram agrupados em dois níveis. Nota-se maior frequência de casos com escores maiores que 1 em tumores extradigestórios.

Tabela 15 - Frequência de escores do marcador Sinaptofisina em dois níveis, conforme a localização trato digestório.

	sinaptofisina		Total
	Escore 0 ou 1	Escore > 1	
Digestório Não	3	10	13
Sim	5	2	7
Total	8	12	20

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A distribuição normal da idade, evidente pela proximidade entre a média e a mediana, sem casos excepcionais, permite o cálculo estatístico apresentado. Nota-se a ausência de diferenças nas médias de idade nos grupos divididos conforme os escores da imunomarcção em todos os marcadores. A ausência da excepcionalidade foi também coincidente com os dados da literatura, conforme as três melhores séries encontradas na revisão bibliográfica, onde não se relatam casos em crianças (MODLIN *et al.*, 2003; SOGA, 2003; TAAL e VISSER, 2004).

A diferença entre a distribuição dos casos por sexo é provavelmente ao acaso, pois não há diferença estatisticamente significativa na presente amostra, mesmo quando a variável é confrontada com as demais variáveis do estudo. A literatura é discordante neste assunto, como visto nos resultados divergentes de Modlin e colaboradores (2003) e de Taal e Visser (2004). O primeiro grupo afirma que a incidência é ligeiramente predominante em homens e o segundo, em mulheres. Apesar do presente estudo não ter o desenho necessário para a verificação de incidência, pode-se considerar que não houve impacto desta variável nos resultados da presente análise na expressão dos marcadores testados. Nenhum marcador mostrou diferenças quando agrupados por sexo. Assim como a idade, o sexo enquanto variável atesta a adequação da amostra.

A distribuição dos casos conforme a localização da neoplasia não é coincidente com os achados da literatura, com maior número de casos de doença do sistema respiratório, e menor de doença do sistema digestório que o descrito na literatura. Soga (2003) mostra em seu trabalho que a distribuição é diversa da encontrada, com predomínio do trato digestório com 64% dos casos. Modlin (2003) e Taal e Visser (2005) também são concordantes, mostrando igualmente o predomínio no trato digestório, seguidos do trato pulmonar, com diferenças de poucos pontos percentuais. O presente achado, portanto, não pode ser creditado ao acaso. Provavelmente, há viés de seleção por vários motivos. O primeiro é a dificuldade

diagnóstica intrínseca a alguns destes tumores tenham induzido um relativo viés de amostragem nos laboratório participantes, pois um destes é de referência em imunistoquímica, e concentra justamente um maior número de casos de diagnóstico difícil à morfologia, o que pode ter contribuído para o maior freqüência de casos pulmonares e de outros sítios que o descrito na literatura.

Esta fragilidade da amostra impede a imediata transposição da significância estatística quando da localização do tumor enquanto variável, para cada marcador. A possibilidade de erro estatístico do tipo II está aumentada, ou seja, a impossibilidade de discernir diferenças existentes entre os grupos. Assim, as conclusões do presente estudo poderão e deverão ser testadas em outros modelos experimentais, pois o erro do tipo I - discernir diferenças onde não existem – podem ser averiguadas conforme o valor do p, porém as questões inconclusivas como similaridades de médias e freqüências entre grupos não podem ser descartadas como nulidades (DORIA FILHO, 1999). Para permitir cálculos estatísticos, a topografia foi melhor estudada com a recodificação da variável em outras duas, conforme a localização ou não nos sistemas digestório e respiratório. Assim, as variáveis de localização ficam com dois grupos cada, facilitando a visualização e comparação.

Também por motivos de seleção, a distribuição dos casos pela classificação tumoral também é diversa à bibliografia referida. O presente estudo mostra a maioria dos casos malignos conforme a estratificação em dois níveis, e na classificação em quatro, os casos concentram-se nos dois estratos de pior prognóstico. Soga (2003) verifica que a distribuição pende para casos de carcinóide típico, ou seja, de baixo grau, com 9430 casos contra os 1374 atípicos e os 1038 variantes. Esta particularidade amostral pode ser explicada pelo critério de inclusão diferenciado, não aleatório, dos casos no presente estudo, muito diferente ao caráter revisional do estudo de Soga. Utilizaram-se apenas os casos de peças cirúrgicas, por necessidade logística e ética, no intuito de garantir a reprodutibilidade dos exames e o mínimo prejuízo ao material examinado. O universo de pesquisa, portanto, inclui apenas as lesões grandes o suficientes para repetição dos exames, o que explica por si só a tendência à concentração de neoplasias malignas na amostra obtida.

A distribuição amostral pode também refletir a baixa detecção precoce de neoplasias devido às características sócio-econômicas e culturais locais. Este tipo de viés foi previamente verificado e justificado pela variável qualidade de acesso à serviços de saúde da população brasileira, quer seja esta assistida pelo Sistema Único de Saúde ou por serviços da medicina complementar (KLIGERMAN, 2002). Em um estudo de estimativa de incidência de câncer no Brasil, Klingerman (2002) concorda com a variabilidade da incidência regional. Esta também foi encontrada no câncer infantil quando comparados a regiões desenvolvidas dentro e fora do país (BRAGA *et al.*, 2002), e no câncer de tireóide (COELI *et al.*, 2005), que mostra maior taxa de incidências naquelas regiões onde há maior cobertura da assistência médica. Assim, a amostra examinada no presente estudo não reflete a distribuição da doença, e não pode ser considerada para fins de estimativas. Esta característica amostral – um subconjunto não aleatório de neoplasias do universo de pesquisa - que definiu as ferramentas de cálculo estatístico utilizadas no presente estudo, no intuito de evidenciar as diferenças entre freqüências e médias de um grupo conforme um status qualitativo, não ponderado.

A imunomarcção para Sinaptofisina mostrou-se muito prevalente na amostra, com apenas um caso completamente negativo, porém sete de coloração fraca em células ocasionais, consideradas negativas na estratificação em dois níveis. Quando comparada à idade, sexo e classificação histológica, não apresenta diferenças estatísticas. A tabulação cruzada com a localização no trato digestório ou fora do trato digestório, entretanto, mostra que há freqüências estatisticamente diferentes da expressão entre as neoplasias quando a imunomarcção é estratificada em dois níveis. Assim, pode-se inferir que a Sinaptofisina é fortemente expressa no grupo extradigestório, sendo pouco intensamente expressa nos casos localizados no aparelho digestório. Este achado difere de Ericksson e Loyd (2004), que verificam a perda na positividade da cromogranina em tumores pouco diferenciados do trato gastrointestinal, não verificando o mesmo para a sinaptofisina, que contém expressão variável não relacionada à topografia. Entretanto, o presente estudo foi incapaz de aferir esta diferença de expressão entre os grupos quando utilizada uma escala em quatro níveis, o que pode representar apenas a heterogeneidade da intensidade da reação e não da presença da

sinaptofisina nos tumores neuroendócrinos digestórios. Nas demais topografias não houve diferenças estatisticamente significativas, ou seja, a frequência e intensidade da expressão da sinaptofisina não é diferente nos grupos de neoplasias do trato respiratório e das demais topografias. Apesar de discordar de critérios topográficos, quando agrupados como entidade, o presente estudo mostra a imunomarcção para a sinaptofisina em tumores neuroendócrinos é prevalente porém heterogênea. Reflete, portanto, os achados pioneiros de Wiedenmann (1986), pesquisador que descreveu este marcador, mesmo com expressão heterogênea em diversos tecidos e tumores, como diagnóstico para células neuroendócrinas e correlato a sua histogênese.

A Cromogranina foi expressa intensamente em todos os casos testados, exceto um, onde é fracamente positiva. A homogeneidade encontrada impede o cálculo estatístico do teste de t de Student, sem graus de liberdade suficientes para a distribuição da frequências em grupos a comparar. Este fato assegura a certeza diagnóstica nos casos selecionados para o estudo, sem contaminações por má seleção. A alta frequência da imunomarcção para a Cromogranina coincide com os achados da literatura, que a referem como o mais confiável marcador para o diagnóstico de neoplasias neuroendócrinas (WILSON e LLOYD, 1984; VAN EEDEN *et al.*, 2002; TAUPENOT *et al.*, 2003; CAMPANA *et al.*, 2007). Erickson e Lloyd (2004) verificaram menor expressão em neoplasias pouco diferenciadas, o que não pode ser averiguado em termos estatísticos no presente estudo, porém no único caso onde houve negatividade da marcação, considerando o escore em dois níveis, tratava-se de um tumor pouco diferenciado. Há, porém, marcação forte nos demais tumores pouco diferenciados, não constituindo diferença significativa nos testes estatísticos para este fim, conforme demonstrados na tabela 7, e por isso não abala a confiança neste marcador para o diagnóstico de diferenciação neuroendócrina.

A proteína S-100 foi prevalente em mais da metade dos tumores examinados. Há frequências diferentes em termos estatísticos, conforme mostrado nas tabelas 12 e 13, com maior frequência de imunomarcção em tumores diversos ao sistema digestório, e apenas um caso positivo para S100 pertencente ao mesmo. Tal marcador já havia sido descrito em células

sustentaculares dos tumores medulares de tireóide e paragangliomas, mas não nas células tumorais principais, o que sugere a sua pouca adequação para uso em diagnóstico diferencial (ERICKSON e LLOYD, 2004). Estudando apenas neoplasias de cabeça e pescoço, não se encontrou positividade para S100 nos tumores de Merckel, a neoplasia neuroendócrina da pele (BATTIFORA e SILVA, 1986). Parece portanto, que a positividade encontrada nestes tumores depende da histogênese da lesão, ou ainda de outra característica intrínseca à topografia, e não do fenótipo neuroendócrino, o que é pode ser verificado nesta diferença aqui detectada. Esta frequência maior da negatividade em células tumorais nos tumores neuroendócrinos de topografia digestória pode ser também interpretado como um obstáculo do uso deste marcador para a definição diagnóstica em neoplasias neuroendócrinas.

O clone 34 β E12 para citoceratinas de alto peso molecular foi expresso em apenas duas neoplasias diferentes, um carcinoma neuroendócrino em fígado, e em um paraganglioma. Erikson e Lloyd (2004) encontraram apenas 4% de positividade para este clone em tumores pituitários, e o consideraram útil para diagnóstico diferencial por ser provavelmente negativo nas neoplasias neuroendócrinas. A presença desta marcação em alguns tumores evidencia que a mera negatividade deste marcador não exclui a possibilidade da doença ter diferenciação neuroendócrina. Apesar disto, Sturm e colaboradores (2003) verificaram que a positividade para 34 β E12 pode excluir todo o espectro das proliferações neuroendócrinas pulmonares. O presente trabalho, porém, verifica que esta afirmação não é válida para neoplasia no fígado e nas proliferações do sistema nervoso autônomo. Há portanto, achado similar com os das neoplasias da pituitária verificados por Erikson e Lloyd (2004). A utilidade prática deste marcador nos tumores do trato respiratório, portanto, não deve ser transposta para as demais topografias.

O Ki67 mostrou diferenças estatisticamente significativas em relação à classificação tumoral da OMS. Isto era previsto, pois tal marcador é considerado fator prognóstico isolado (VAN EEDEN *et al.*, 2002), além de auxiliar no diagnóstico diferencial de neoplasias atípicas e de tumores neuroendócrinos de alto e baixo grau. Não se demonstrou no presente estudo diferenças significativas quando as neoplasias foram estratificadas em dois

níveis – malignas e benignas. Essa aparente incongruência é também, de certa forma, esperada, uma vez que o marcador é positivo em quaisquer lesões proliferativas, independentemente da agressividade de seu comportamento biológico (BROWN e GATTER, 2002). Assim, a estratificação em dois níveis de positividade para o marcador ki67 parece inadequada para fins diagnósticos, pois não é coincidente com os achados morfológicos associados à classificação da OMS. Índices com valores escalares para este marcador já foram previamente correlacionados a prognóstico em diversos tumores, tornando-se um dos mais populares marcadores em pesquisa oncológica, sendo utilizado em mais de 600 trabalhos indexados por ano (BROWN e GATTER, 2002). Nas neoplasias neuroendócrinas gástricas, Boo e colaboradores (2007) sugerem a inclusão deste marcador como padrão para determinação do prognóstico agressivo. Portanto, parece adequada a inclusão deste marcador na propedêutica imunoistoquímica em tumores neuroendócrinos, e como perspectiva futura, que se somem formas quantitativas de medição da imunomarcação, para fins diagnósticos e de predição prognóstica.

O produto da mutação do gene p53 foi demonstrado em cerca de 1/3 dos casos estudados. Esperava-se que esta proteína fosse mais frequentemente expressa nas neoplasias mais agressivas, com possível correlação com as classificações prognósticas utilizadas. Entretanto, conforme os testes estatísticos aplicados, não houve diferença entre os grupos de escore e quanto a positividade das reações quando correlacionadas às demais variáveis. Assim, a correlação entre o mecanismo de dano ao anti-oncogene p53 e as classificações aqui utilizadas dos tumores neuroendócrinos, bem como idade, sexo e localização do tumor não puderam ser aferidas no presente método experimental. Pereira (2004) verificou a existência de correlação da expressão do p53 com o potencial metastático em tumores neuroendócrinos pulmonares, além de uma publicação japonesa ter considerado o p53 como provável marcador de malignidade em neoplasias do apêndice, inclusive nas neuroendócrinas. (YAJIMA *et al.*, 2005). Nestes dois estudos, os critérios de inclusão eram menos amplos que no presente, o que sugere como provável causa da inexistência de correlação das frequências do p53 com as variáveis é da natureza intrínseca destes tumores – sua multiplicidade patogênica e

histogenética. O subconjunto das neoplasias neuroendócrinas de imunomarcação positiva para p53 foi novamente verificado, porém não pôde ser caracterizado na metodologia adotada.

O marcador c-kit teve um comportamento similar ao p53, pois também foi pouco presente, sendo positivo em três casos. Confirma-se a presença de um grupo de neoplasias neuroendócrinas onde a presença do c-kit foi demonstrada, como previamente descrito (ARAKI *et al.*, 2003; CASALI *et al.*, 2004; FEINMESSER *et al.*, 2004; KOSTOULA *et al.*, 2005; LANKAT-BUTTGEREIT *et al.*, 2005; FERRARI *et al.*, 2006). O foco destes trabalhos são os tumores pouco diferenciados, seja dicotomizando grupos ou apenas comparando-os com outros tumores. Nos tumores neuroendócrinos ovarianos, verificou-se 35% de marcação positiva para o c-kit (WILCZYNSKI *et al.*, 2005), o que não pode ser averiguado dada a ausência destes tumores na amostra aqui estudada. Em tumores neuroendócrinos pulmonares pouco diferenciados, de grandes e de pequenas células, também foi encontrada elevadas freqüências de expressão, com respectivamente 55% e 46% (ARAKI *et al.*, 2003). Ao comparar tumores neuroendócrinos bem diferenciados e pouco diferenciados de topografias diversas, Ferrari e colaboradores (2006) encontraram maior expressão deste marcador em tumores bem diferenciados, 8 em 11 tumores testados, enquanto dos 24 bem diferenciados analisados, apenas 3 foram c-kit positivos. Este achado é próximo ao encontrado no presente estudo, porém a expressão do c-kit não se correlacionou com as variáveis propostas que incluíam a diferenciação tumoral. As características amostrais diferentes entre os trabalhos foram a provável causa da não confirmação dos resultados destes estudos. E novamente, o subconjunto de neoplasias neuroendócrinas não pode ser caracterizado conforme as variáveis de estudo pela metodologia utilizada.

O hormônio VEGF compartilhou de aspectos similares ao marcadores p53 e c-kit, sem particularidades estatísticas quando comparado às demais variáveis de estudo. Apesar de presente em cerca de um quinto dos tumores estudados, não se evidencia nenhuma distribuição relativa. A literatura verifica nos adenocarcinomas de próstata que possuem células co-expressando marcadores de diferenciação neuroendócrina e o VEGF têm maior agressividade, com maior tamanho e desdiferenciação, e menor sobrevida (BORRE *et al.*,

2000). Foi também descrito como fator preditivo de metástase em adenocarcinomas do cólon e do reto, tendo o grupo onde este marcador foi positivo, comportamento diverso do grupo onde este foi negativo, mesmo quando o estadiamento patológico é similar (MAEDA *et al.*, 2003). Há um entendimento similar quando estudados adenocarcinomas gástricos precoces, onde foi verificada o maior potencial metastático nas neoplasias que expressavam VEGF, independentemente de seu estadiamento patológico. A expressão deste hormônio também foi correlacionada à maior densidade capilar nos tecidos tumorais e peritumorais, o que provavelmente é o fator determinante do pior prognóstico (ISHIKAWA *et al.*, 2003). Para os tumores neuroendócrinos, são necessários estudo complementares neste sentido – comparar neoplasias de estadiamento patológico similar conforme a positividade para este marcador, pois demonstra-se neste estudo que existem estes subgrupos. O acréscimo de variáveis morfológicas, como a quantificação da microvasculatura estromal – e clínicas, como estadiamento ou sobrevida devem ser utilizadas para a verificação do significado da expressão deste hormônio, além do porque de um subconjunto que o expressa.

A E-caderina foi expressa em apenas três das neoplasias estudadas. Apesar da amostra ser muito pequena, há uma característica intrigante - foi positiva apenas em neoplasias não localizadas nos aparelhos digestório e respiratório – dois carcinomas medulares de tireóide e um paraganglioma. Estas neoplasias são bem diferenciadas, e esperadamente E-caderina positivas. Não foi observada a positividade de marcação nos tumores pulmonares e gastrointestinais, mesmo nos bem diferenciados, ao contrário do previamente descrito (LI *et al.*, 2002; SALON *et al.*, 2004; PELOSI *et al.*, 2005). Nestes trabalhos, a E-caderina tem freqüências decrescentes conforme a diminuição da diferenciação tumoral, o que não foi observado neste experimento. Na topografia gastrointestinal, um estudo refere que a perda da expressão da e-caderina pode ser considerada como fator prognóstico negativo, por associar-se à metástases linfonodais (BOO *et al.*, 2007). A maior perda da expressão deste marcador pode estar relacionada à característica amostral com predomínio de lesões nos estratos menos diferenciados conforme a classificação da OMS. O presente modelo experimental foi, portanto, adequado para discernir um aspecto da imunomarcagem da e-

caderina. Há alguma característica fenotípica ou histogenética nos tumores neuroendócrinos gastrointestinais e respiratórios que tornam a perda da expressão da E-caderina mais freqüente que nas demais topografias estudadas. Afinal, são exatamente estes tumores, somados aos pancreáticos, que vem sendo agrupados para estudo dada a provável histogênese em comum, no intestino primitivo anterior (VAN EEDEN *et al.*, 2002). O achado, portanto, sugere estudos pormenorizados a fim de excluir falhas amostrais e também para incluir outras variáveis de estudo para a sua melhor caracterização.

O marcador CD99 foi apenas fracamente positivo em dois casos, marcando também células ocasionais em outros dois. A freqüência da positividade a este marcador em tumores neuroendócrinos foi previamente descrita como decrescente conforme a desdiferenciação tumoral (PELOSI *et al.*, 2006). Um trabalho anterior, do mesmo autor principal (2000), relata 25% de positividade para este marcador em tumores neuroendócrinos gastrointestinais e pulmonares. Por ser alvo da moderna terapêutica com anticorpos específicos, é possível que algum subconjunto de doentes possam se beneficiar da inclusão deste marcador nos protocolos de imunoistoquímica para fatores prognósticos. Além disso, Pelosi (2000, 2006) também refere como provável a associação entre a adesão celular e a regulação para menos da proliferação celular com este marcador. A ausência da sua expressão significa perda da ancoragem celular e maior proliferação e, conseqüentemente, a lesão adquire maior potencial metastático, que a torna a perda da expressão do CD99 um fator prognóstico adverso. Com marcação presente em 20% dos tumores estudados, a presente amostra entretanto não é correlata a quaisquer outras variáveis em estudo.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os marcadores Cromogranina e Sinaptofisina são úteis na caracterização dos tumores neuroendócrinos em imunohistoquímica. O marcador S100 é também útil, principalmente quando localizado nos sítios do trato digestório.

O marcador 34 β E12 é útil na caracterização fenotípica dos tumores neuroendócrinos em imunohistoquímica, sendo inespecífico para os tumores neuroendócrinos. A positividade para este marcador desfavorece porém não exclui a possibilidade de diferenciação neuroendócrina.

O marcador ki67 é mais freqüente e intensamente presente nas neoplasias neuroendócrinas de alto grau conforme a classificação da OMS. Deve ser incluído na rotina de estudo em tumores neuroendócrinos por sua utilidade diagnóstica e prognóstica. Os achados sugerem novos protocolos de pesquisa com estudo quantitativo da sua expressão, para a melhoria da interpretação prognóstica deste marcador.

A perda da expressão da E-caderina nos tumores digestórios e respiratórios é maior que nas demais localidades, merecendo posterior caracterização em estudos orientados à variáveis correlatas ao prognóstico e histogênese.

Os marcadores prognósticos p53, c-kit, VEGF, e CD99 são expressos em subconjuntos dos tumores neuroendócrinos, não correlatos com o sexo, idade, localização do tumor, e classificação tumoral. São perspectivas de estudo a inclusão, dentre outros dados, informações sobre estadiamento clínico e patológico, densidade e invasividade vascular, de sítio primário ou metastático, para que o potencial metastático seja variável prognóstica a ser estudada ou predita com o auxílio destes marcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ^{1 2 3}

ALVES, V. A. F., *et al.* **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1999

ARAKI, K., *et al.* Frequent overexpression of the c-kit protein in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v.40, n.2, May, p.173-80. 2003.

ASHMAN, L. K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. **Int J Biochem Cell Biol**, v.31, n.10, Oct, p.1037-51. 1999.

AYLON, Y. e OREN, M. Living with p53, Dying of p53. **Cell**, v.130, n.4, Aug 24, p.597-600. 2007.

BARAKAT, M. T., *et al.* Neuroendocrine tumours. **Endocr Relat Cancer**, v.11, n.1, Mar, p.1-18. 2004.

BATTIFORA, H. e SILVA, E. G. The use of antikeratin antibodies in the immunohistochemical distinction between neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin, lymphoma, and oat cell carcinoma. **Cancer**, v.58, n.5, Sep 1, p.1040-6. 1986.

BOO, Y. J., *et al.* Gastric neuroendocrine carcinoma: clinicopathologic review and immunohistochemical study of E-cadherin and Ki-67 as prognostic markers. **J Surg Oncol**, v.95, n.2, Feb 1, p.110-7. 2007.

BORRE, M., *et al.* Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. **Clin Cancer Res**, v.6, n.5, May, p.1882-90. 2000.

BRAGA, P. E., *et al.* [Childhood cancer: a comparative analysis of incidence, mortality, and survival in Goiania (Brazil) and other countries]. **Cad Saude Publica**, v.18, n.1, Jan-Feb, p.33-44. 2002.

BROWN, D. C. e GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v.40, n.1, Jan, p.2-11. 2002.

CAMPANA, D., *et al.* Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? **J Clin Oncol**, v.25, n.15, May 20, p.1967-73. 2007.

CAPELLA, C., *et al.* Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. **Digestion**, v.55 Suppl 3, p.11-23. 1994.

_____. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. **Virchows Arch**, v.425, n.6, p.547-60. 1995.

¹ Abreviaturas dos periódicos indexados no Index Medicus conforme listagem por meio eletrônico obtida em setembro de 2007 no sítio ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pubmed/J_Medline.txt

² ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

³ _____. **NBR: 10520**: Informação e documentação – Citações em documentos - Apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

- CASALI, C., *et al.* The prognostic role of c-kit protein expression in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. **Ann Thorac Surg**, v.77, n.1, Jan, p.247-52; discussion 252-3. 2004.
- COELI, C. M., *et al.* [Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.49, n.4, Aug, p.503-9. 2005.
- DELELLIS, R. A. e DAYA, Y. Neuroendocrine system. In: S. STERNBERG (Ed.). **Histology for Pathologists**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Neuroendocrine system., p.1133-1148
- DELELLIS, R. A., *et al.* **Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs**. Lyon: IARC press. 2003. 320 p. (World Health Organization Classification of Tumours)
- DELELLIS, R. A. M. D. e OSAMURA, R. Y. M. D. Neuroendocrine Tumors: An Overview. [Review]. **Pathology Case Reviews**, v.11, n.6, November/December p.229-234. 2006.
- DORIA FILHO, U. **Introdução à Bioestatística**. São Paulo: Negócio. 1999. 151 p.
- ERICKSON, L. A. e LLOYD, R. V. Practical markers used in the diagnosis of endocrine tumors. **Adv Anat Pathol**, v.11, n.4, Jul, p.175-89. 2004.
- FEINMESSER, M., *et al.* c-kit expression in primary and metastatic merkel cell carcinoma. **Am J Dermatopathol**, v.26, n.6, Dec, p.458-62. 2004.
- FERRARI, L., *et al.* Kit protein (CD117) and proliferation index (Ki-67) evaluation in well and poorly differentiated neuroendocrine tumors. **Tumori**, v.92, n.6, Nov-Dec, p.531-5. 2006.
- FREEMAN, A., *et al.* A comparison of basal cell markers used in the prostate. **Histopathology**, v.40, n.5, May, p.492-4. 2002.
- GOLD, J. S. e DEMATTEO, R. P. Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model. **Ann Surg**, v.244, n.2, Aug, p.176-84. 2006.
- HARPER, M. E., *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostatic tumours and its relationship to neuroendocrine cells. **Br J Cancer**, v.74, n.6, Sep, p.910-6. 1996.
- HEINRICH, M. C., *et al.* Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. **J Clin Oncol**, v.21, n.23, Dec 1, p.4342-9. 2003.
- HELPA, B. e KOLLERMANN, J. Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence? **Virchows Arch**, v.438, n.1, Jan, p.86-91. 2001.
- HIROTA, S., *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science**, v.279, n.5350, Jan 23, p.577-80. 1998.
- ISHIKAWA, M., *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. **Jpn J Clin Oncol**, v.33, n.1, Jan, p.21-7. 2003.

JAFFER, S. e BLEIWEISS, I. J. Beyond hematoxylin and eosin--the role of immunohistochemistry in surgical pathology. . **Cancer Investigation**, v.22, n.3, p.445-465. 2004.

KLIGERMAN, J. Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil - 2002. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.2, p.175-179. 2002.

KOSTOULA, V., *et al.* Expression of c-kit (CD117) in neuroendocrine tumours--a target for therapy? **Oncol Rep**, v.13, n.4, Apr, p.643-7. 2005.

LANKAT-BUTTGEREIT, B., *et al.* Effects of the tyrosine kinase inhibitor imatinib on neuroendocrine tumor cell growth. **Digestion**, v.71, n.3, p.131-40. 2005.

LANTUEJOUL, S., *et al.* Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. **Am J Surg Pathol**, v.22, n.10, Oct, p.1267-76. 1998.

LI, C. C., *et al.* Alterations of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin expression in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. **Virchows Arch**, v.440, n.2, Feb, p.145-54. 2002.

MAEDA, K., *et al.* Correlation between vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in T1 carcinoma of the colon and rectum. **Surg Today**, v.33, n.10, p.736-9. 2003.

MCNUTT, N. S. The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. **J Cutan Pathol**, v.25, n.10, Nov, p.521-9. 1998.

MODLIN, I. M., *et al.* A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. **Cancer**, v.97, n.4, Feb 15, p.934-59. 2003.

OSAMURA, R. Y. M. D., *et al.* Neuroendocrine Carcinomas of Diverse Sites. [Review]. **Pathology Case Reviews**, v.11, n.6, November/December, p.282-291. 2006.

PAPAVASSILIOU, A. G. p53-Targeted drugs: intelligent weapons in the tumor-suppressing arsenal. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.126, n.2, Feb, p.117-8. 2000.

PEARSE, A. G. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. **J Histochem Cytochem**, v.17, n.5, May, p.303-13. 1969.

PELOSI, G., *et al.* CD99 immunoreactivity in gastrointestinal and pulmonary neuroendocrine tumours. **Virchows Arch**, v.437, n.3, Sep, p.270-4. 2000.

_____. Decreased immunoreactivity of CD99 is an independent predictor of regional lymph node metastases in pulmonary carcinoid tumors. **J Thorac Oncol**, v.1, n.5, Jun, p.468-77. 2006.

_____. Alteration of the E-cadherin/beta-catenin cell adhesion system is common in pulmonary neuroendocrine tumors and is an independent predictor of lymph node metastasis in atypical carcinoids. **Cancer**, v.103, n.6, Mar 15, p.1154-64. 2005.

PEREIRA, J. C. N. **Estudo da correlação entre incidência de metástases em tumores carcinóides típicos broncopulmonares e biomarcadores teciduais, variáveis clínicas e índices de risco.** Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. 189 p.

REYES, A., *et al.* Neuroendocrine carcinomas (carcinoid tumor) of the testis. A clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases. **Am J Clin Pathol**, v.120, n.2, Aug, p.182-7. 2003.

SALON, C., *et al.* E-cadherin-beta-catenin adhesion complex in neuroendocrine tumors of the lung: a suggested role upon local invasion and metastasis. **Hum Pathol**, v.35, n.9, Sep, p.1148-55. 2004.

SCHENKEL, A. R., *et al.* CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. **Nat Immunol**, v.3, n.2, Feb, p.143-50. 2002.

SCOTLANDI, K., *et al.* CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. **Cancer Res**, v.60, n.18, Sep 15, p.5134-42. 2000.

SHINTANI, S., *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.40, n.1, Jan, p.13-20. 2004.

SOGA, J. Carcinoids and their variant endocrinomas. An analysis of 11842 reported cases. **J Exp Clin Cancer Res**, v.22, n.4, Dec, p.517-30. 2003.

SOLCIA, E., *et al.* **Histologic typing of endocrine tumours**. Lyon: Heidelberg:Springer Verlag. 2000 (WHO International Histologic classification of tumours)

STERNBERGER, L. A., *et al.* The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. **J Histochem Cytochem**, v.18, n.5, May, p.315-33. 1970.

STURM, N., *et al.* 34BetaE12 expression along the whole spectrum of neuroendocrine proliferations of the lung, from neuroendocrine cell hyperplasia to small cell carcinoma. **Histopathology**, v.42, n.2, Feb, p.156-66. 2003.

TAAL, B. G. e VISSER, O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. **Neuroendocrinology**, v.80 Suppl 1, p.3-7. 2004.

TAUPENOT, L., *et al.* The chromogranin-secretogranin family. **N Engl J Med**, v.348, n.12, Mar 20, p.1134-49. 2003.

TRAVIS, W. D., *et al.* **Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart**. Lyon: IARC press. 2004 (World Health Organization Classification of Tumors.)

_____. Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. **Hum Pathol**, v.29, n.3, Mar, p.272-9. 1998.

VAN EEDEN, S. e OFFERHAUS, G. J. Historical, current and future perspectives on gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. **Virchows Arch**, v.448, n.1, Jan, p.1-6. 2006.

VAN EEDEN, S., *et al.* Classification of low-grade neuroendocrine tumors of midgut and unknown origin. **Hum Pathol**, v.33, n.11, Nov, p.1126-32. 2002.

WIEDENMANN, B., *et al.* Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.10, May, p.3500-4. 1986.

WILCZYNSKI, S. P., *et al.* Expression and mutational analysis of tyrosine kinase receptors c-kit, PDGFRalpha, and PDGFRbeta in ovarian cancers. **Hum Pathol**, v.36, n.3, Mar, p.242-9. 2005.

WILSON, B. S. e LLOYD, R. V. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. **Am J Pathol**, v.115, n.3, Jun, p.458-68. 1984.

YAJIMA, N., *et al.* Immunohistochemical expressions of cytokeratins, mucin core proteins, p53, and neuroendocrine cell markers in epithelial neoplasm of appendix. **Human Pathology**, v.36, n.11, p.1217-1225. 2005.

YESNER, R. What is a neuroendocrine tumor? **Am J Surg Pathol**, v.24, n.2, Feb, p.319-20. 2000.

_____. Heterogeneity of so-called neuroendocrine lung tumors. **Exp Mol Pathol**, v.70, n.3, Jun, p.179-82. 2001.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Tabela completa dos resultados

9.2. Termo de esclarecimento consentimento livre e esclarecido

9.3. Termo de compromisso para uso de dados em arquivo

9.4. Autorização para empréstimo de blocos e lâminas

9.5. Ficha de aprovação do projeto no comitê de ética médica – FM/UnB

9.1. Tabela completa dos resultados

Paciente	Origem	Idade	Sexo	Neoplasia	Ki67	P53	ckit	e-cad	VEGF	CD99	S100	34bE12	sinap	Cromo
1	LIB/Biópsia	61	F	CN de fígado	++	-	-	-	+	-	++++	++	+	+++
2	LIB/Biópsia	73	M	CN intestino delgado	++	-	-	-	-	-	++++	-	++++	++++
3	LIB/Biópsia	90	M	CN em linfonodo	+++	++++	-	-	-	-	-	-	++	++++
4	LIB/Biópsia	44	F	CN reto	++++	++	-	-	-	-	-	-	++	++++
5	LIB/Biópsia	61	M	Paraganglioma	++	-	-	-	-	-	-	-	+	++++
6	LIB/Biópsia	51	M	CN cólon	+++	++++	++	-	++	-	++++	-	+	++
7	HUB	50	F	Ca medular de tireóide	++	-	-	++	+	-	-	-	+++	+++
8	HUB	50	F	CN em linfonodo	+++	+	-	-	-	-	-	-	+++	++++
9	HUB	57	F	Paraganglioma	-	-	++	++	++	++	+++	+++	++++	++++
10	HUB	53	F	CN pulmão	+	+++	-	-	+	-	-	-	+	+++
11	HUB	67	F	CA pequenas células do pulmão	+	-	-	-	-	-	+++	-	++	+++
12	HUB	74	F	CN Reto	+	+	-	-	-	-	++	-	-	+
13	HUB	32	F	CA medular tireóide	+	++++	++	+++	-	+	++++	+	++++	++++
14	HUB	48	M	CN cólon metastático fígado	+	-	-	-	+	-	++	-	+	++++
15	HUB	74	F	CN cólon	+	++	-	-	+++	-	++++	-	++	++++
16	Micra	70	F	CN colo uterino	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++++
17	Micra	52	M	Carcinóide brônquico	-	-	-	-	++	+	-	-	-++	++++
18	Micra	60	F	Carcinóide brônquico	-	-	-	-	++	+	-	-	+++	++++
19	Micra	52	M	Carcinóide Pulmão	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
20	Micra	58	M	CA pequenas células do pulmão	++	+	-	-	-	++	++++	-	++	++++

9.2. Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido

Nome do paciente:

Autorizo o empréstimo de blocos de parafina, a coleta e utilização de dados clínicos do paciente identificado acima, para o médico Gustavo Henrique Soares Takano, responsável sobre a pesquisa científica intitulada “Perfil imunistoquímico dos tumores neuroendócrinos”. Esta pesquisa será realizada no laboratório de imunopatologia da Universidade de Brasília, como parte do programa de pós-graduação em Ciências Médicas, obedecendo a critérios pré-estabelecidos no projeto de pesquisa, e aprovado no comitê de ética médica.

Reconheço a natureza científica do procedimento, e com isso a ausência de ônus ou ganhos para minha pessoa, bem como não serão subtraídos ou acrescentados dados ao meu prontuário médico. Reconheço que a pesquisa será realizada apenas em material previamente analisado, não sendo necessária coleta ou outros procedimentos envolvendo minha pessoa.

O pesquisador compromete-se a retornar o material ao término da pesquisa com o mínimo de prejuízo para a posterior repetição de lâminas histopatológicas dos blocos analisados, bem como manter o anonimato do paciente e o sigilo das informações obtidas.

Nome:

Assinatura:

Parentesco (se pertinente):

2ª via paciente

9.3. Anexo 3 - Termo de compromisso para uso de dados em arquivo

Termo de compromisso para uso de dados em arquivo

Título do projeto: Perfil imunistoquímico dos tumores neuroendócrinos

Pesquisadores: Gustavo Henrique Soares Takano
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto

Os pesquisadores do projeto acima identificado assumem o compromisso de :

1. Preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados.
2. Que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão
3. Que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Brasília, outubro de 2006

Gustavo Henrique Soares Takano
(pesquisador responsável)

Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(orientador)

9.4. Anexo 4 - Autorização para empréstimo de blocos de parafina para pesquisa científica

Autorização para empréstimo de blocos de parafina para pesquisa científica

Autorizo o empréstimo de blocos de parafina, a coleta e utilização de dados clínicos, sob guarda deste laboratório, para o médico Gustavo Henrique Soares Takano, responsável sobre a pesquisa científica intitulada "Perfil imunistoquímico dos tumores neuroendócrinos". Esta pesquisa será realizada no laboratório de imunopatologia da Universidade de Brasília, como parte do programa de pós-graduação em Ciências Médicas, obedecendo a critérios pré-estabelecidos. A pesquisa só terá início quando aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB.

O pesquisador compromete-se a retornar o material retirado após as reações sem prejuízo para a posterior reprodutibilidade de lâminas histopatológicas do caso analisado.

Laboratório:

Responsável Técnico:

9.5. Anexo 5 – Parecer FM/UnB



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 078/2006

Título: Perfil imunofenotípico de tumores neuroendócrinos

Pesquisador responsável: Gustavo Henrique Soares Takano

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 06/12/2006

Proposição do(a) relator(a)

(x) Aprovação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 31/01/2007

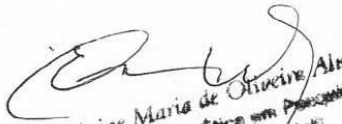
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 31/01/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 31/01/2007, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 01 de fevereiro de 2007.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB

