

SANDRO JOSÉ MARTINS

**Contribuição à avaliação prognóstica de pacientes com
adenocarcinoma pulmonar avançado:
estudo imunohistoquímico da expressão do Fator 1 de
Transcrição Tiroideano e da Metaloproteinase 9**

Tese apresentada ao Departamento de Cardio-
Pneumologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Pneumologia

Orientadora: Prof^a. Teresa Yae Takagaki

São Paulo

2005

Há sempre o Sol brilhando além das nuvens sombrias; quando ele é colocado no mundo íntimo, nenhuma ameaça de trevas consegue apagar-lhe, ou sequer diminuir-lhe a intensidade do lume. Dedicado à minha esposa Crystina, sempre a minha luz.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Nina e José Martins**, pelo apoio e estímulo constantes ao meu aprimoramento.

Ao Dr. **Raimundo Camurça de Meneses**, pelo modelo de conduta universitária, pautada por desvelo no cumprimento da função, denodo, e empenho pelo bem comum. Meu mestre e amigo.

Ao Dr. **José Rodrigues Pereira**, profissional devotado ao progresso na terapêutica do câncer de pulmão, pelas oportunidades de estudo e pelo diálogo científico sempre profícuo.

Aos Drs. **Álvaro Lessa, Cléber Gomes, Francisco Dantas, Livia Andrade, e Neide Pithon**, colegas assistentes do Serviço de Oncologia do Hospital Santa Izabel, em Salvador, pela compreensão e suporte durante meus períodos de atividade acadêmica.

Aos Drs. **Alecsander Silva, Célia Gallo, Fernando Silva e Nélon Ho**, pelo auxílio oportuno nos estudos laboratoriais e na revisão das fontes de dados primários.

Ao Professor Dr. **Mário Terra Filho**, por apoiar de primeira hora este Projeto e oferecer continuamente estímulo ao meu crescimento profissional.

À Professora Dra. **Leila Antonangelo** e ao Dr. **Hélio Minamoto**, pelas contribuições valiosas para esta Tese, feitas por ocasião da minha aula de qualificação.

À Professora Dra. **Vera Luisa Capelozzi**, pela colaboração e incentivo permanente, sem os quais seria árida a consecução deste Projeto.

À Professora Dra. **Teresa Yae Takagaki**, pela paciência, compreensão e apoio irrestrito. Sua orientação tornou reto e prazenteiro o caminho a esta Tese.

Um nobre da China antiga uma vez perguntou ao seu médico, membro mais novo de uma tradicional família de curandeiros, qual deles era o maior perito na sua arte. O médico, cuja reputação era tal que seu nome se tornara sinônimo de ciência médica na China, respondeu: “Meu irmão mais velho vê o espírito da doença e o remove antes que ele tome forma, então seu nome não é conhecido fora da nossa casa. Meu outro irmão cura a doença quando ela mal se instalou, então seu nome não é conhecido fora da nossa vizinhança. Quanto a mim, eu punciono veias, prescrevo poções e massageio a pele, então de tempos em tempos meu nome é divulgado e é ouvido entre os nobres”.

Estória tradicional chinesa

RESUMO

MARTINS, S. J. Contribuição à avaliação prognóstica de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado: estudo imunohistoquímico do fator 1 de transcrição tireoideano e da metaloproteinase 9. 2005. 78 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O valor prognóstico da expressão do Fator 1 de Transcrição Tireoideano (TTF-1) e da metaloproteinase-9 (MMP-9) foi avaliado em 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado. Foram fatores de mau prognóstico: baixa capacidade funcional ($P = 0,017$), baixa expressão do TTF-1 ($P = 0,001$) e alta expressão da MMP-9 ($P = 0,008$). Identificaram-se três grupos de risco para mortalidade: baixo risco (TTF-1 $\geq 40\%$ e MMP-9 $< 80\%$; sobrevida: 127,6 semanas), risco intermediário (TTF-1 $< 40\%$ ou MMP-9 $\geq 80\%$; sobrevida: 39,0 semanas) e alto risco (TTF-1 $< 40\%$ e MMP-9 $\geq 80\%$; sobrevida: 16,4 semanas). Com a detecção destes marcadores é possível a identificação de subgrupos de pacientes com prognósticos clinicamente distintos.

Descritores: Câncer de pulmão. Adenocarcinoma. Fator 1 de transcrição tireoideano. Metaloproteinase 9. Análise de sobrevida. Fatores prognósticos.

ABSTRACT

MARTINS, S. J. Contribution to the prognostic assessment of patients with advanced lung adenocarcinoma: evaluation by immunohistochemical methods of thyroid transcription factor-1 and matrix metalloproteinase-9. 2005. 78 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The prognostic value of Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) tumor expression was evaluated in 51 patients with advanced lung adenocarcinoma. Poor performance status ($P = 0.017$), low TTF-1 ($P = 0.001$), and high MMP-9 ($P = 0.008$) were independent prognostic factors. There was three risk groups: low risk (TTF-1 $\geq 40\%$ and MMP-9 $< 80\%$; median survival: 127.6 wk), intermediate risk (TTF-1 $< 40\%$ or MMP-9 $\geq 80\%$; median survival: 39.0 wk), and high risk (TTF-1 $< 40\%$ and MMP-9 $\geq 80\%$; median survival: 16.4 wk). Evaluation of TTF-1 and MMP-9 may allow us to identify different, clinically meaningful, prognostic groups of lung adenocarcinoma patients.

Key-words: Lung cancer. Adenocarcinoma. Thyroid transcription factor-1. Matrix metalloproteinase-9. Survival analysis. Prognostic factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1	Valor prognóstico para sobrevida de diferentes limiares de expressão do TTF-1 em pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.....	29
Figura 2	Valor prognóstico para sobrevida de diferentes limiares de expressão da MMP-9 em pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.....	30
Figura 3	Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier segundo a capacidade funcional (escala de Karnofsky).....	35
Figura 4	Avaliação do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo a capacidade funcional (escala de Karnofsky).....	36
Figura 5	Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier segundo a expressão do TTF-1.....	37
Figura 6	Avaliação do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo a expressão do TTF-1.....	38
Figura 7	Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier segundo a expressão da MMP-9.....	39
Figura 8	Avaliação do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo a expressão da MMP-9.....	40
Figura 9	Curvas de risco pelo modelo de Cox para expressão de TTF-1 e MMP-9.....	44
Figura 10	Demonstração gráfica do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo os estratos de expressão de TTF-1 e MMP-9.....	45

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Perfil clínico e demográfico dos 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar	25
Tabela 2	Estudo morfológico e biológico dos tumores de 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar	26
Tabela 3	Correlação entre características biológicas, demográficas e clínicas de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado	27
Tabela 4	Análise de sensibilidade prognóstica para sobrevida pelo modelo de riscos proporcionais de Cox de diferentes níveis de expressão de TTF-1 e MMP-9	28
Tabela 5	Características demográficas e clínicas de 47 pacientes com adenocarcinoma pulmonar segundo a expressão imunohistoquímica do TTF-1	31
Tabela 6	Características demográficas e clínicas de 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar segundo a expressão imunohistoquímica da MMP-9	32
Tabela 7	Análise de sobrevida univariada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado	33
Tabela 8	Estimativas pontuais de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma pulmonar segundo capacidade funcional (escala de Karnofsky) e expressão de TTF-1 e MMP-9	34
Tabela 9	Modelo de riscos proporcionais de Cox para predição do tempo de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado	41
Tabela 10	Estatística de verossimilhança ('log likelihood' – LL) dos modelos prognósticos possíveis (comparados ao modelo nulo) para pacientes com adenocarcinoma pulmonar	42
Tabela 11	Número de pacientes, sobrevida mediana e pontual segundo grupo prognóstico para 47 pacientes com adenocarcinoma de pulmão avançado ou metastático ..	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CPCNP	Carcinoma pulmonar de célula não pequena
IHQ	Imunohistoquímica
MMP	Metaloproteinase de matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
HC	Hospital das Clínicas
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de confiança
EUA	Estados Unidos da América
MVP	Mitomomicina C, vimblastina e cisplatina
MAPK	Proteinoquinase mitógeno-ativada
ERK	Quinase regulada por estímulo extracelular

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. A quimioterapia no câncer de pulmão.....	11
1.2. Modelos prognósticos aplicados ao adenocarcinoma pulmonar..	12
1.3. Angiogênese tumoral e metaloproteínases.....	15
1.4. Expressão do fator 1 de transcrição tireoideano.....	18
1.5. Objetivos.....	20
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	21
2.1. Casuística.....	22
2.2. Avaliação morfológica e imunohistoquímica.....	23
2.3. Desenho do estudo.....	25
2.4. Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO.....	50
5. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	
A - Estadiamento do Câncer de Pulmão.....	76
B - Classificação Histológica do Adenocarcinoma Pulmonar.....	77
C - Capacidade funcional: Escala de Karnofsky.....	78

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O número de pacientes com câncer de pulmão cresce ano a ano. No Brasil, entre 1980 e 1997 a mortalidade pela doença aumentou 43% entre os homens e 84% entre as mulheres (ZAMBONI, 2002). Para todo o país, o número de casos novos estimados pelo Instituto Nacional do Câncer para o ano 2003, entre homens e mulheres, foi de 22.085 e 16.230, respectivamente; estes valores representaram um acréscimo de 53% e 190% referente às estimativas de 2000. Considerando essa tendência, aliada aos baixos índices de cura característicos da doença, reduzir a incidência do câncer de pulmão será um dos grandes desafios para a Saúde Pública nas próximas décadas.

A ressecção cirúrgica completa é a única modalidade de tratamento potencialmente curativa para pacientes com carcinoma pulmonar de célula não pequena (CPCNP). Entretanto, mesmo a sobrevivência de pacientes com CPCNP em estádios iniciais é insatisfatória: cerca de 25% a 40% dos pacientes em estadios I adequadamente tratados apresentarão recorrência sistêmica e perecerão da doença (DUARTE et al., 1998; INOUE et al., 1998; KWIATKOWSKI et al., 1998; MARTINI et al., 1995; WADA et al., 1996; YOUNES et al., 2004). O estadiamento patológico da doença (ANEXO A) é o método mais acurado para o estabelecimento do prognóstico destes pacientes (MOUNTAIN, 1995; MOUNTAIN, 1997).

Para melhorar os resultados da cirurgia no CPCNP, emprega-se atualmente a quimioterapia sistêmica pós-operatória ou adjuvante. Apesar de capaz de resgatar um número de vidas adicionais, seu benefício ainda é limitado, com ganhos absolutos em termos de sobrevivência da ordem de 5% em cinco anos (ARRIAGADA et al., 2004; HOTTA et al., 2004b). Há grande interesse na identificação de características histopatológicas e biomoleculares que permitam, ao lado do estadiamento da doença, estratificar os pacientes segundo o risco de recidiva e óbito (ANELLI, 1998; CARVALHO et al., 1997; DEMARCHI et al., 2000; STRAUSS et al., 1995).

1.1. A quimioterapia no câncer de pulmão

O retardo no diagnóstico do câncer de pulmão em nosso meio faz com que menos de 15% dos pacientes tenham oportunidade de receber tratamento cirúrgico radical por se encontrarem com doença nos estadios I e II. Nos pacientes clinicamente capazes de receber algum tratamento oncológico, aproximadamente 90% serão candidatos a receber quimioterapia antineoplásica em alguma época da evolução de sua doença, seja com intento neoadjuvante, adjuvante ou mesmo paliativo (MARTINS & PEREIRA, 1999).

O tratamento do CPCNP por drogas citotóxicas é conhecido desde os anos 50, quando KARNOFSKY et al. (1955) descreveram o uso da mostarda nitrogenada para este propósito. Seguiram-se descrições da atividade de muitas outras drogas, tais como ciclofosfamida, vimblastina, bleomicina, metotrexato, doxorrubicina, procarbazida e nitrosuréia. Na década de 70 apareceram relatos de diversas associações destes fármacos, produzindo invariavelmente substancial toxicidade e resposta tumoral em menos de 20% dos pacientes. A introdução da cisplatina no tratamento do CPCNP no início dos anos 80 foi um marco terapêutico importante. Utilizada em monoterapia ou em associação com etoposídeo, doxorrubicina e ciclofosfamida, vimblastina ou vindesina (associada ou não à mitomicina C), proporcionava respostas mensuráveis em cerca de 30% dos pacientes. No decorrer da última década, vários agentes citotóxicos ativos contra o CPCNP foram incorporados à prática clínica, com destaque para drogas como vinorelbina, gencitabina, taxanas e inibidores da topoisomerase-I, que se mostraram capazes de produzir respostas mensuráveis em 20% a 30% dos pacientes, mesmo em monoterapia, com perfil de toxicidade muito favorável em relação à cisplatina (HOTTA et al., 2004a). Para os esquemas terapêuticos contemporâneos, que associam esses novos quimioterápicos à derivados da platina, os resultados terapêuticos tem sido ligeiramente melhores. Com efeito, meta-análises com dados de ensaios clínicos recentes demonstraram

vantagem para regimes contendo cisplatina em termos de aumento de sobrevida e melhoria na qualidade de vida no CPCNP avançado (HOTTA et al., 2004a; LILENBAUM et al., 1998; NSCLCCG, 1995). No entanto, estes benefícios não são extensivos a todos: há progressão clínica durante a quimioterapia em 30% a 45% dos pacientes, e estes não logram maior sobrevida ou melhoria temporária dos sintomas decorrentes da neoplasia (PAESMANS et al., 1997). Como a toxicidade clínica é comum, afetando a maioria dos pacientes em algum momento da quimioterapia, para se otimizar o uso do armamentário clínico disponível é oportuno e necessário o desenvolvimento de modelos probabilísticos, que minimizem a chance de se oferecer tratamentos fúteis pela seleção inicial adequada do paciente e seu tratamento.

Um modelo prognóstico para pacientes com adenocarcinoma de pulmão avançado provavelmente contribuirá para uma melhoria quantitativa e qualitativa do tempo de sobrevida neste cenário clínico, uma vez que permitirá a identificação *a priori* um grande número de pacientes com menor probabilidade de se beneficiar dos atuais regimes de tratamento baseados em derivados da platina e que poderão, por sua vez, tanto ser poupados dos efeitos colaterais da quimioterapia convencional quanto possivelmente ser candidatos a tratamentos alternativos. Adicionalmente, este conhecimento poderá vir a ser útil no contexto da doença ressecável (estadio I a IIIA), quando está em questão a indicação de quimioterapia complementar pós-operatória.

1.2. Modelos prognósticos aplicados ao adenocarcinoma pulmonar

Nas últimas décadas, dados epidemiológicos dos Estados Unidos, Japão e Europa consistentemente mostram um crescimento da incidência de adenocarcinoma pulmonar, sendo este o tipo histológico de CPCNP preponderante em homens abaixo de 50 anos, em mulheres, em não-fumantes e em ex-fumantes. No Japão e nos Estados Unidos, tornou-se forma mais

freqüente de câncer de pulmão (MORITA, 2002; TRAVIS et al., 1996) e na Europa sua incidência aumentou em 10% nos últimos 20 anos (JANSSEN-HEIJNEN & COEBERGH, 2003; SKULADOTTIR et al., 2000), mudanças atribuídas à redução no consumo e à adoção de filtros nos cigarros (JANSSEN-HEIJNEN et al., 1995; THUN et al., 1997).

No Brasil, dados da série histórica de 6.070 pacientes com câncer de pulmão tratados no Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho nos últimos 25 anos, mostram semelhante modificação do perfil histológico, com a proporção de casos de adenocarcinoma tendo aumentado de 24%, entre 1979 e 1984, para 35% entre 1999 e 2004 (YAMAGUCHI et al., 2004a). Se por um lado é aceito hoje que os resultados do tratamento do CPCNP não variam segundo o tipo histológico, a introdução na prática clínica de terapias baseadas em alvos moleculares torna incerto o significado clínico desta mudança de perfil no longo prazo.

Os adenocarcinomas de pulmão são histologicamente muito heterogêneos e em apenas uma minoria dos casos é encontrado um único padrão arquitetural (BRAMBILLA et al., 2001). A classificação proposta em 1999 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Associação Internacional para Estudo do Câncer de Pulmão reconhece cinco padrões histológicos principais e cinco variantes menos freqüentes (ANEXO B). São doenças que compartilham algumas características celulares e moleculares, mas apresentam comportamento clínico e prognóstico muito variado.

Na medicina, como destacado por WINDELER (2000), o desenvolvimento de modelos prognósticos tem por objetivo permitir uma melhor compreensão da história natural das doenças, oferecer um meio de auxílio prático à decisão médica, e prestar-se para um melhor planejamento de futuros ensaios clínicos. Estes modelos são ainda valiosos para se informar ao paciente e à sua família sobre o que pode ser esperado do tratamento, auxiliando-os em suas escolhas. Aliás, são estas, em última análise, que nortearão a conduta clínica e definitivamente influenciarão o prognóstico individual.

Há um crescente interesse no estudo de parâmetros histológicos, assim como de medidas mais sofisticadas como perfis gênicos e proteômicos, para se lançar luz sobre os complexos mecanismos por trás da diversidade de comportamento clínico do adenocarcinoma pulmonar. Usando uma abordagem epidemiológica, BRUNDAGE et al. (2002) identificaram em 887 estudos publicados entre 1990 e 2000 um total de 169 características do tumor ou do paciente descritas como fatores prognósticos no CPCNP. Na doença avançada, os dados clínicos mais freqüentemente relacionados ao prognóstico foram o estadió clínico, a capacidade funcional e o emagrecimento, mas havia relatos de diferenças quanto a gênero, idade, sintomas, qualidade de vida e alterações laboratoriais (anemia, hipercalcemia, hipoalbuminemia, proteinúria e elevação de desidrogenase láctica, dímero D ou do complexo trombina-antitrombina III).

Contrastando com o cenário da doença ressecável (estadió I a IIIA), poucos estudos avaliaram a relação entre marcadores moleculares e o prognóstico em pacientes com doença localmente avançada ou metastática. Este quadro tem se modificado nos últimos anos com o interesse pela pesquisa de padrões de expressão gênica para estratificação prognóstica (BEER et al., 2002; BHATTACHARJEE et al., 2001; ENDOH et al., 2004; GORDON et al., 2003; TOMIDA et al., 2004), e com a farmacogenética (ROSELL et al., 2002), onde se usa a análise molecular de alterações do genoma (desequilíbrio cromossômico, metilação de regiões promotoras, superexpressão gênica, alteração de microtúbulos e polimorfismos) para se individualizar a quimioterapia antineoplásica.

Acreditando que o câncer de pulmão origina-se do epitélio brônquico normal, como resultado de um longo processo cumulativo de alterações genéticas induzidas por carcinógenos, diversos autores tem explorado o valor prognóstico da genotipagem múltipla em secções microdissecadas do tumor. BHATTACHARJEE et al (2001) estudaram amostras tumorais de 186 pacientes com câncer pulmonar (127 adenocarcinomas, 21 carcinomas

epidermóides, 20 carcinóides e 6 carcinomas de células pequenas) e 17 espécimes de epitélio brônquico saudável, por hibridização de 3.312 oligonucleotídeos com arranjos tissulares micro-dispostos. Eles demonstraram que o perfil de expressão gênica permitia não apenas a distinção entre os tipos histológicos, mas o agrupamento dos adenocarcinomas em quatro subclasses: o grupo C1 apresentava maior expressão de genes associados à divisão e proliferação celular; o grupo C2, maior expressão de marcadores de diferenciação neuroendócrina; o grupo C3 compartilhava alguns genes expressos pelos grupos C1 e C2, assim como genes expressos pelo epitélio normal e pelo grupo C4; o grupo C4 era constituído por tumores com expressão aumentada do Fator 1 de Transcrição Tireoideano e de marcadores expressos nos pneumócitos tipo II. O grupo C2 apresentou o pior prognóstico enquanto o grupo C4 foi associado a um maior tempo de sobrevida, mas estes resultados não foram mantidos após ajuste por estadiamento clínico. Em um refinamento desta abordagem, BEER et al. (2002) encontraram 50 genes capazes de identificar subgrupos com prognóstico distinto, em uma amostra de 86 pacientes com adenocarcinoma pulmonar, e mais recentemente GORDON et al. (2003) identificaram cinco genes, entre 19.000, cuja expressão aumentada permitia a diferenciação prognóstica de 46 pacientes com adenocarcinoma pulmonar e doença no estágio I. É possível que o estudo de um número restrito de marcadores, idealmente identificados por técnicas de uso mais difundido, venha a ser um meio auxiliar importante no planejamento terapêutico desta doença.

1.3. Angiogênese tumoral e metaloproteinases

A angiogênese é um evento biológico essencial para importantes processos orgânicos, tais como a embriogênese, a inflamação, o reparo de feridas e para o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases (FOLKMAN, 1990). No adulto, a taxa de crescimento capilar endotelial é baixa; no entanto, durante a cicatrização de feridas, células endoteliais dormentes

se tornam ativadas, capazes de promover proteólise da matriz extracelular, migração e proliferação endotelial, resultando no desenvolvimento de novos capilares. Em contraste com a regulação precisa da angiogênese neste processo, a angiogênese tumoral é caracterizada por um desequilíbrio homeostático que favorece a superexpressão de fatores angiogênicos e a inibição de fatores angiostáticos. A lista de fatores que podem atuar na complexa regulação deste processo é extensa (GIATROMANOLAKI, 2001), incluindo fatores angiogênicos, como os fatores de crescimento endotelial vascular, o fator básico de crescimento de fibroblastos, o fator de necrose tumoral- α e a interleucina-8, e alguns angiostáticos, como a trombospondina e a proteína induzida por interferon- γ .

O potencial angiogênico tumoral em geral é inferido por medidas de vascularização tumoral em preparações histológicas através de métodos de imunohistoquímica (IHQ) para voltados à identificação de antígenos endoteliais. Muitos estudos foram publicados sobre a associação entre vascularização tumoral, metástases e sobrevida em pacientes com CPCNP. A maioria dos autores observou que elevada vascularização estava associada a um pior prognóstico (ANGELETTI et al., 1996; COX et al., 2001a; COX et al., 2001b; DUARTE et al., 1998; GIATROMANOLAKI, 2001; LUCCHI et al., 1997), observação não confirmada em algumas séries extensas (CHANDRACHUD et al., 1997; PASTORINO et al., 1997). Invariavelmente são estudos retrospectivos, em espécimes histológicos obtidos de pacientes com doença em estádios iniciais, tratados por cirurgia radical. Em poucos relatos o valor prognóstico da vascularização foi avaliado à luz de características outrora descritas como relevantes. Uma grande proporção dos pacientes nestas séries apresentou recidiva da doença durante o seguimento, quando então outras modalidades terapêuticas foram empregadas. É surpreendente que poucos autores tenham explorado o efeito da quimioterapia ou radioterapia posteriores nos seus modelos prognósticos.

O papel da degradação biológica da membrana basal e matriz extracelular, necessária à migração endotelial nos estágios iniciais da angiogênese, tem recebido muita atenção ultimamente, por ser essencial também aos processos de invasão tumoral e metástase (CHAMBERS & MATRISIAN, 1997; GOTO et al., 2001). Ela permite não apenas a invasão vascular e linfática pelo tumor como ainda seu crescimento local sustentado, pela liberação e ativação de fatores de crescimento e mitógenos presentes na matriz extracelular (CHAMMAS & BRENTANI, 2002). Células endoteliais ativadas e tumores produzem pelo menos 25 tipos de matrixinas ou metaloproteinases da matriz (MMP), enzimas com domínios funcionais comuns e que compartilham mecanismos de ativação Ca^{++} - e Zn^{++} - dependentes, responsáveis por estes eventos (NELSON et al., 2000; VISSE & NAGASE, 2003). Mais especificamente, a gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) respondem pela degradação do colágeno tipo IV e da laminina, que são componentes da membrana basal (SATO et al., 1994; VISSE & NAGASE, 2003).

A expressão de MMP, embora baixa ou não detectável na maioria dos tecidos normais, encontra-se aumentada em muitos tumores, como no CPCNP (THOMAS et al., 2000), onde tem sido associada com um maior risco de invasão tumoral a estruturas adjacentes e metástases. Em um trabalho seminal, COX et al., (2000) demonstraram em uma série de 169 pacientes com doença localizada, estadio I a IIIA, que a expressão da MMP-9 conferia menor chance de sobrevida no CPCNP. Na mesma linha de pesquisa, estes autores notaram em 167 pacientes com doença ressecada que a expressão aumentada da MMP-9 (acima de 20% do tumor) estava presente em 52% dos pacientes e conferia probabilidade de sobrevida duas vezes menor que entre aqueles com baixa expressão da enzima (COX et al., 2001a). A expressão observada não foi homogênea, sendo mais intensa na borda infiltrativa do tumor. Estudos de nossa Instituição (MINAMOTO et al., 2003; PINTO et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2004b) e outros grupos (FUJISE et al., 2000; SHOU et al., 2001; SIENEL et al., 2003)

encontraram também um pior prognóstico associado à expressão da MMP-9 no CPCNP, particularmente no adenocarcinoma pulmonar (REICHENBERGER et al., 2001; SIMI et al., 2004).

Diversas abordagens foram usadas para se detectar MMP-9 no câncer de pulmão, tais como estudo de secções de tecidos, lisado tissular, lavado brônquico e amostras de soro. Neste contexto, os métodos IHQ apresentam algumas vantagens: permitem a análise da expressão do marcador dentro do contexto histológico original do tumor, favorecem o uso de espécimes de arquivo, e geram informação de maior valor prático dado o menor custo dos reagentes e a maior difusão desta tecnologia. Deve-se considerar como limitações, no entanto, a possibilidade de perda de sensibilidade do método por alterações antigênicas, causadas pelo processo de fixação do tecido, e sua natureza semi-quantitativa.

1.4. Expressão do fator 1 de transcrição tireoideano

Há poucas informações na literatura sobre o comportamento clínico e biológico de subtipos de adenocarcinoma pulmonar que expressam o fator 1 de transcrição tireoideano (TTF-1), também conhecido como Nkx2.1 ou proteína intensificadora de ligação tireoide-específica. Trata-se de uma nucleoproteína de 38-kDa com uma região homeobox e dois domínios de ativação transcricional capazes de transativar genes ativos na morfogênese pulmonar. Regula no pulmão, pela ligação direta com seus promotores, a expressão tecido-específica da apoproteína A surfactante, apoproteína B surfactante, apoproteína C surfactante, antígeno de células-clara e da proteína T1- α (BINGLE, 1997; WHITSETT et al., 2004).

A expressão do TTF-1 inicia-se muito cedo na morfogênese pulmonar. No pulmão murino em desenvolvimento, a expressão do TTF-1 é primeiro notada na emergência do divertículo laringotraqueal e se localiza primariamente no epitélio brônquico. Uma vez que as vias aéreas periféricas se desenvolvem, a expressão do marcador notadamente concentra-se no

epitélio respiratório distal (WHITSETT et al., 2004). No pulmão humano adulto a expressão do TTF-1 restringe-se aos pneumócitos tipos I e II e ao epitélio respiratório nas áreas de menor calibre, em alvéolos, sacos alveolares, dutos alveolares e bronquíolos respiratórios (FABBRO et al., 1996; YATABE et al., 2002).

Há uma expressão diferencial do TTF-1 nos tumores de pulmão segundo o tipo histológico. É frequentemente detectado nos adenocarcinomas (71% a 76%) e nos tumores de pequenas células (81% a 92%), sendo incomum no carcinoma epidermóide ou no carcinoma de grandes células (DI LORETO et al., 1997; FABBRO et al., 1996; LAU et al., 2002b). No adenocarcinoma bronquioloalveolar, a expressão do marcador é conspícua apenas nos tumores não-mucinosos (JEROME MARSON et al., 2004; LAU et al., 2002a; SAAD et al., 2004). A maioria dos autores enfatiza a utilidade do TTF-1 no diagnóstico diferencial quanto ao sítio primário do tumor (CAMILLERI-BROET et al., 2004; LAU et al., 2002b), mas poucos avaliaram o possível papel da expressão do TTF-1 na carcinogênese pulmonar (BORCZUK et al., 2004; YATABE et al., 2002).

Não há consenso na literatura sobre o valor prognóstico da expressão do TTF-1 no adenocarcinoma pulmonar. Estudos pioneiros de séries de pacientes com CPCNP localizado sugerem que o risco de óbito entre pacientes com tumores que expressam TTF-1 pode ser maior (PUGLISI et al., 1999), equivalente (MYONG, 2003; PELOSI et al., 2001; STENHOUSE et al., 2004) ou menor (HAQUE et al., 2002; TAN et al., 2003; YATABE et al., 2002) que entre aqueles cujos tumores apresentam baixa ou nenhuma expressão do marcador.

1.5. Objetivos

- 1.5.1. Descrever a relação entre a expressão dos marcadores TTF-1 e MMP-9 com dados demográficos e clínicos de pacientes com adenocarcinoma de pulmão avançado.

- 1.5.2. Desenvolver um modelo prognóstico incorporando informações demográficas, clínicas e biológicas que seja útil para estratificação de risco entre pacientes com adenocarcinoma de pulmão avançado que recebem paliativamente quimioterapia antineoplásica baseada em derivados de platina.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1. Casuística:

A partir do registro de pacientes do Ambulatório de Câncer de Pulmão da Disciplina de Pneumologia do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), uma amostra de conveniência de 67 pacientes admitidos para tratamento entre 1997 e 1999 foi selecionada para o estudo, pelos seguintes critérios:

- Diagnóstico histológico de adenocarcinoma.
- Espécime histológico arquivado no setor de anatomia patológica do HC-FMUSP.
- Capacidade funcional não inferior a 60% na escala de Karnofsky (ANEXO C).
- Estadio clínico IIIB ou IV.
- Lesão mensurável ou avaliável em área não irradiada previamente.
- Sem quimioterapia prévia.
- Radioterapia prévia encerrada há não menos de 90 dias, sem indicação para tratamento radioterápico paliativo.
- Ausência de contra-indicação médica para quimioterapia com derivados da platina.

Em revisão de lâminas correspondentes aos espécimes em arquivo, foi notado que não havia material adequado para exames subseqüentes de 16 pacientes. Assim, da amostra inicial um total de 51 pacientes foi incluído no estudo. Estes pacientes foram cuidados segundo as rotinas do Ambulatório, seguindo procedimentos padrões de diagnóstico, tratamento e acompanhamento vigentes na Instituição. Nenhum procedimento médico adicional foi indicado com a finalidade exclusiva de permitir a participação do paciente no estudo. O protocolo desta investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

No período, a combinação mitomicina C, vimblastina e cisplatina (MVP) foi o esquema de tratamento paliativo de eleição (SPAIN, 1993). Foi administrado um máximo de quatro a seis ciclos, sempre que o médico assistente julgou haver benefício clínico, com base na evolução sintomática associada ou não a resposta clínica mensurável pelos critérios radiológicos da OMS. Estava à discrição do médico assistente indicar a substituição do esquema anterior pela combinação cisplatina e etoposídeo (ARDIZZONI et al., 1999), ou da cisplatina por carboplatina (NATALE, 1997), de acordo com o perfil clínico do paciente.

2.2. Avaliação morfológica e imunohistoquímica

Os marcadores biológicos foram estudados em cortes de espécimes incluídos em parafina, obtidos previamente por ocasião do procedimento diagnóstico, arquivados no setor de anatomia patológica. Cortes histológicos de 3 μ de espessura foram seccionados dos respectivos blocos de parafina, montados em lâminas revestidas por organo-silano e corados por hematoxilina-eosina. As lâminas foram revistas por dois patologistas que as analisaram separadamente e concordaram quanto ao diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, sendo registrada adicionalmente a presença de componente bronquioloalveolar, sem a distinção de seus subtipos (BRAMBILLA et al., 2001).

Para o exame IHQ, cortes histológicos de 3 μ de espessura foram montados sobre lâminas revestidas por poli-L-lisina, desparafinizados em xileno, reidratados através de álcoois graduados. A recuperação antigênica foi efetuada por calor sob pressão por 3 minutos, em tampão citrato 10 mM (pH 6,0). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada expondo as lâminas montadas a peróxido de hidrogênio a 2%, por 30 minutos. Os cortes foram lavados, em água desionizada e em solução salina tampão Tris contendo 0,1% de albumina sérica bovina (pH 7,4). As lâminas foram então incubadas com soro normal de

coelho a 20% por 10 minutos para bloquear alguma coloração inespecífica, sendo imediatamente incubadas com o anticorpo primário, pelo período noturno, a uma temperatura de quatro graus Celsius. Foram usados os anticorpos murinos monoclonais 56-2A4, que reconhece as formas latente e ativa da MMP-9 (Biogen, EUA; diluição 1:100), e SPT24, que reconhece a região N-terminal da molécula do TTF-1 (Novocastra, Reino Unido; diluição 1:100). Os cortes foram corados lavados com solução salina tampão Tris e incubados seqüencialmente com anti-IgG murina de coelho biotinilada (Dako, EUA; diluição 1:400) e estreptavidina combinada in vitro com peroxidase biotinilada (Dako, EUA; diluição 1:1000). O produto da reação foi revelado com o cromógeno diaminobenzidina. Por fim, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, desidratadas através de álcoois graduados e montadas em resina. Os controles positivos conhecidos foram incluídos com cada lote e controles negativos tiveram o anticorpo primário omitido. A coloração marrom nuclear ou citoplasmática foi considerada como evidência de expressão de TTF-1 ou MMP-9, respectivamente.

A expressão do marcador foi avaliada por morfometria, com uma ocular graduada (100 pontos, 50 linhas), por patologista familiarizado com o método. Inicialmente, em baixa magnificação, foi selecionada a região com maior expressão do marcador. Então, ao aumento de 400X, a ocular graduada foi usada para contar a fração de pontos sobrepostos às estruturas positivamente coradas. A expressão do marcador foi tomada como a média do percentual de estruturas coradas em 10 campos microscópicos.

2.3. Desenho do estudo

Este é um estudo descritivo, retrospectivo, visando a avaliação do papel prognóstico dos marcadores biológicos selecionados em relação à sobrevida global de pacientes com adenocarcinoma de pulmão que receberam quimioterapia antineoplásica no contexto paliativo, ambulatorial. O Quadro 1 apresenta as variáveis principais do estudo.

Quadro 1. Principais variáveis do estudo.

Variável	Escala	Unidade de Medida
1. Gênero	Nominal	Masculino ou Feminino
2. Histologia	Nominal	Bronquioloalveolar ou Outro Adenocarcinoma
3. Condição atual	Nominal	Óbito ou Sem Contato
4. Escala de Karnofsky	Ordinal	Intervalos de 10%
5. Estadio clínico	Nominal	IIIB ou IV
6. Tosse	Nominal	Presente ou Ausente
7. Hemoptise	Nominal	Presente ou Ausente
8. Dor torácica	Nominal	Presente ou Ausente
9. Dispneia	Nominal	Presente ou Ausente
10. Emagrecimento	Nominal	$\geq 10\%$ peso habitual ou Não
11. Resposta à quimioterapia	Nominal	Presente (parcial ou completa) ou Ausente
12. Idade	Intervalar	Anos
13. Tempo de sobrevida	Intervalar	Dias
14. Expressão do TTF-1	Intervalar	Percentual
15. Expressão da MMP-9	Intervalar	Percentual

2.4. Análise estatística

A descrição da tendência central e dispersão nas variáveis em escala ordinal ou escala intervalar de distribuição assimétrica foi feita, respectivamente, pela mediana e intervalo total. Variáveis em escala nominal e agrupamentos representativos de variáveis ordinais foram descritos pela tabulação de frequência.

A associação entre variáveis em escala ordinal ou nominal dicotômica foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e descrita em uma matriz de correlação, sendo testadas as seguintes hipóteses:

$$H_0: \rho = 0$$

$$H_1: \rho \neq 0$$

O método de Kaplan-Meier foi usado para análise do tempo de sobrevida, que foi calculado como o intervalo em dias entre a admissão para tratamento paliativo e a ocorrência de óbito (evento); pacientes vivos ou perdidos de seguimento foram censurados para análise na data do último contato. O tempo de sobrevida foi descrito em semanas no texto. Através da função cumulativa de sobrevivência foram obtidas as medianas e estimativas pontuais de probabilidade de sobrevida. O teste logrank (ou Mantel-Cox) foi escolhido para comparação da sobrevida entre estratos de variáveis prognósticas.

O modelo de riscos proporcionais de Cox foi usado para análise multivariada de sobrevida. A seleção de variáveis para modelos probabilísticos foi feita pela incorporação sucessiva de fatores preditores com valor P associado menor que 0,10, sendo retidos ao final apenas aqueles com valor-p associado menor que 0,05. A avaliação da proporcionalidade dos riscos ao longo do tempo, principal pressuposto para o modelo de Cox, foi feita por método gráfico e analítico. Gráficos lineares com log-log (logaritmo da função cumulativa de riscos)

nas abscissas e tempo de seguimento nas ordenadas foram usados para verificação da proporcionalidade de riscos; nestes, a equidistância vertical entre as curvas para cada estrato da variável sugere que não há violação deste princípio. A existência de variação temporal nas razões de risco foi ainda testada pela inclusão de uma nova variável no modelo, representando um termo de interação entre o fator preditor e o tempo de seguimento. O resultado do teste de Wald para o coeficiente de regressão associado ao termo de interação foi tomado como evidência estatística de tendência de aumento ou decréscimo na razão de risco ao longo o tempo (KLEIN & MOESCHBERGER, 1997).

Os fatores prognósticos independentes foram associados pelo método de consolidação conjuntiva, uma técnica de análise multivariada usada para incorporar informação prognóstica múltipla sem o uso de equações matemáticas complexas (FEINSTEIN & WELLS, 1990). Neste método, a população do estudo é estratificada segundo cada fator preditor e suas funções cumulativas de sobrevivência são comparadas; estratos com funções equivalentes são agregados, passando a constituir uma classe de uma nova variável-índice, que passa a reter a informação prognóstica dos fatores originais.

Todos os valores P usados para inferência estatística foram bicaudais e os limites dos intervalos de confiança (IC) foram calculados para 95%. O gerenciamento da base de dados e a análise estatística foram realizados através do programa SPSS versão 11 (Chicago, EUA).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

A idade mediana entre os 51 pacientes foi de 57 anos (intervalo: 36 a 81). As características dos pacientes estudados estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Perfil clínico e demográfico dos 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar.

Característica	Número de Pacientes	%
Idade em anos		
35 a 44	5	9,8
45 a 54	15	29,4
55 a 64	15	29,4
≥ 65	16	31,4
Gênero		
Masculino	32	62,7
Feminino	19	37,3
Condição atual		
Óbito	41	80,4
Sem contato	10	19,6
Escala de Karnofsky		
60%	13	25,5
70% ou 80%	29	56,9
90% ou 100%	9	17,6
Estadio clínico		
IIIB	24	47,0
IV	27	53,0
Sintomas Respiratórios		
Dispnéia	34	66,7
Dor torácica	27	52,9
Tosse	26	51,0
Hemoptise	7	13,7
Emagrecimento	32	62,7
Resposta à quimioterapia	16	31,4

Com a exceção de dois pacientes, um tratado com o cisplatina e etoposídeo e outro com carboplatina, mitomicina C e vimblastina, os demais pacientes receberam quimioterapia com o esquema MVP.

Todos os pacientes apresentaram alguma expressão da MMP-9 (mediana: 78,7%; variação: 15,2% a 96,1%). O material disponível de quatro pacientes (7,8%) foi exíguo para contagem de células marcadas e estes foram excluídos das análises subseqüentes que incluíram a expressão do TTF-1. A expressão mediana do TTF-1 foi de 30,0%, com um máximo de 85,9%. Em oito pacientes (17,0%) não foi detectada expressão do marcador.

Tabela 2. Estudo morfológico e biológico dos tumores de 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar.

Característica	Número de Pacientes	%
Espécime		
Biópsia pulmonar	37	72,5
Biópsia transbrônquica	14	27,5
Histologia		
Bronquioloalveolar	6	11,7
Outro padrão	47	88,3
Expressão do TTF-1	39	83,0% *
Expressão da MMP-9	51	100,0%

* Os espécimes de quatro pacientes não foram adequados para avaliação da expressão do TTF-1.

Houve correlação fraca entre a expressão do TTF-1 e o subtipo histológico bronquioloalveolar, e a ausência de dispnéia (Tabela 3). A expressão da MMP-9 não se relacionou aos dados biológicos, clínicos e demográficos estudados.

Tabela 3. Correlação entre características biológicas, demográficas e clínicas de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.

		TTF-1	MMP-9	Idade	Gênero	Histologia	Karnofsky	Estadio	Tosse	Hemoptise	Dor Torácica	Dispneia	Perda de Peso
MMP-9	ρ	0,24	1,00										
	Valor P	0,12	-										
Idade	ρ	-0,54	-0,08	1,00									
	Valor P	0,72	0,58	-									
Gênero	ρ	0,09	0,01	-0,12	1,00								
	Valor P	0,53	0,94	0,38	-								
Histologia	ρ	0,32	-0,12	0,04	-0,22	1,00							
	Valor P	0,03	0,41	0,77	0,12	-							
Karnofsky	ρ	0,27	0,23	-0,39	0,13	0,10	1,00						
	Valor P	0,06	0,13	0,01	0,37	0,47	-						
Estadio	ρ	-0,39	-0,15	0,46	-0,07	-0,02	-0,22	1,00					
	Valor P	0,79	0,31	0,01	0,59	0,88	0,12	-					
Tosse	ρ	0,15	0,13	-0,01	0,13	0,08	-0,25	0,07	1,00				
	Valor P	0,32	0,40	0,92	0,34	0,58	0,07	0,62	-				
Hemoptise	ρ	-0,09	0,18	-0,09	0,01	0,17	-0,08	0,07	0,39	1,00			
	Valor P	0,53	0,23	0,49	0,97	0,22	0,57	0,60	0,01	-			
Dor Torácica	ρ	-0,27	-0,13	0,16	-0,06	-0,40	-0,60	0,03	0,07	-0,03	1,00		
	Valor P	0,06	0,40	0,27	0,67	0,01	0,01	0,81	0,62	0,81	-		
Dispneia	ρ	-0,33	-0,14	0,23	-0,12	-0,18	-0,55	0,14	0,25	0,27	0,59	1,00	
	Valor P	0,02	0,37	0,10	0,40	0,21	0,01	0,33	0,07	0,06	0,01	-	
Perda de Peso	ρ	-0,22	0,26	-0,13	0,23	-0,22	-0,08	0,02	0,30	0,34	0,35	0,34	1,00
	Valor P	0,14	0,08	0,37	0,09	0,13	0,59	0,88	0,03	0,01	0,01	0,01	-
Resposta à Quimioterapia	ρ	0,21	0,10	0,29	0,08	-0,25	-0,14	-0,22	0,05	-0,16	0,08	-0,17	-0,21
	Valor P	0,15	0,50	0,04	0,56	0,08	0,31	0,12	0,71	0,25	0,58	0,22	0,15

Nota: Em negrito, associações significativas ao nível de confiança de 95%.

Houve associação fraca positiva entre idade e pior estadió clínico, menor capacidade funcional, e resposta à quimioterapia; a queixa de dor torácica foi direta e significativamente associada com a presença de dispnéia e menor capacidade funcional, e inversamente com a presença de componente histológico bronquioloalveolar (Tabela 3).

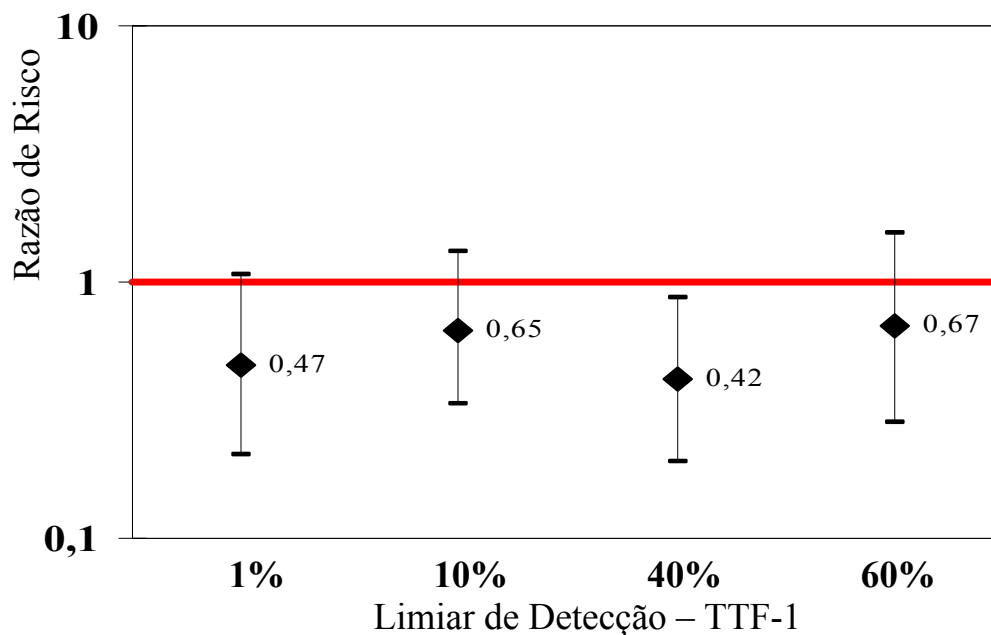
Tabela 4. Análise de sensibilidade prognóstica para sobrevida pelo modelo de riscos proporcionais de Cox de diferentes níveis de expressão de TTF-1 e MMP-9.

Marcador	Ponto de Corte	Nível Crítico	Razão de Risco (I.C. 95%)*	Valor-p
TTF-1	2º Decil	1%	0,47 (0,21 – 1,07)	0,073
	4º Decil	10%	0,65 (0,33 – 1,30)	0,220
	6º Decil	40%	0,42 (0,20 – 0,87)	0,019
	8º Decil	60%	0,67 (0,28 – 1,55)	0,351
MMP-9	2º Decil	45%	1,54 (0,78 – 3,05)	0,213
	4º Decil	75%	1,10 (0,59 – 2,06)	0,766
	6º Decil	80%	2,02 (1,05 – 3,91)	0,036
	8º Decil	90%	1,94 (0,79 – 4,71)	0,145

* I.C. 95%: Limites do intervalo de confiança de 95%.

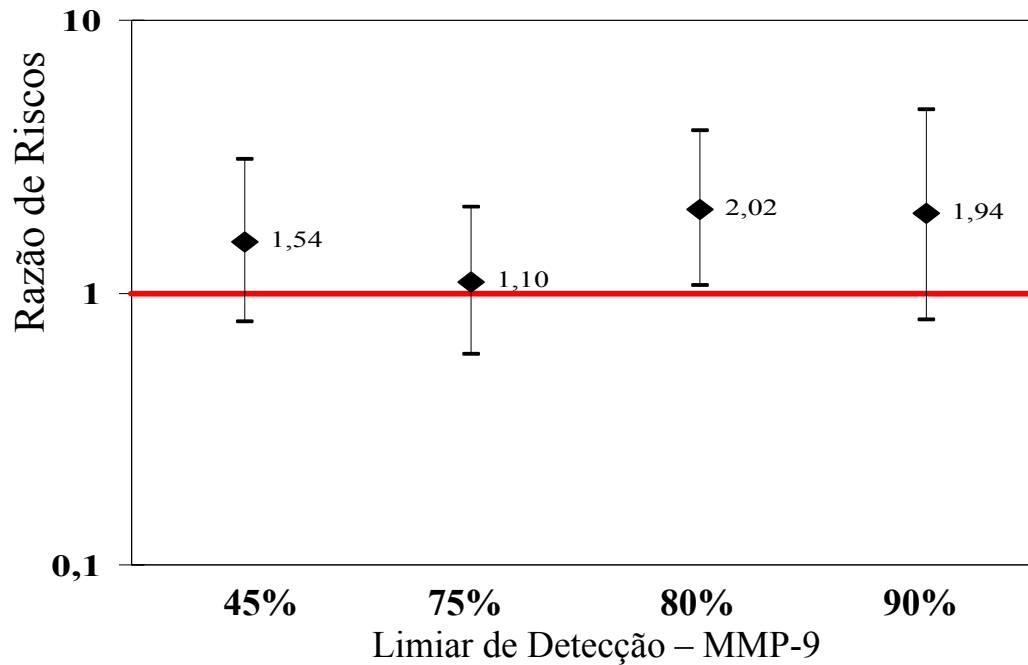
A sobrevida mediana no estudo foi de 41,6 semanas (IC 95%: 28,7 a 54,4), com estimativa de sobrevida em 1 e 2 anos de 45% e 22%, respectivamente. Diferentes pontos de corte para os marcadores biológicos, associados ao 2º, 4º, 6º e 8º decil de suas distribuições, foram avaliados quanto à importância prognóstica pelo método de Kaplan-Meier (Tabela 4, Figuras 1 e 2). Estes pontos de corte foram determinados arbitrariamente, tomando-se como critério a necessidade de se assegurar um mínimo de 10 eventos no menor grupo de comparação.

Figura 1: Valor prognóstico para sobrevida de diferentes limiares de expressão do TTF-1 em pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.



Nota: Ordenada em escala logarítmica.
Modelo de riscos proporcionais de Cox.

Figura 2: Valor prognóstico para sobrevida de diferentes limiares de expressão da MMP-9 em pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.



Nota: Ordenada em escala logarítmica.
Modelo de riscos proporcionais de Cox.

Os valores associados ao 6º decil para expressão de TTF-1 (40%) e MMP-9 (80%) foram escolhidos como pontos de corte para análises posteriores por maximizarem o contraste em termos de sobrevida. Adicionalmente, os pacientes agrupados segundo este ponto de corte (6º decil) apresentavam distribuição homogênea quanto às principais características clínicas e demográficas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Características demográficas e clínicas de 47 pacientes com adenocarcinoma pulmonar segundo a expressão imunohistoquímica do TTF-1.

	Expressão do TTF-1		Valor P *
	< 40%	≥ 40%	
Idade			
< 65 anos	18 (64,3%)	13 (68,4%)	0,99
≥ 65 anos	10 (35,7%)	6 (31,6%)	
Gênero			
Masculino	18 (64,3%)	13 (68,4%)	0,99
Feminino	10 (35,7%)	6 (31,6%)	
Histologia			
Bronquioloalveolar	2 (7,1%)	4 (21,1%)	0,20
Outro padrão	26 (92,9%)	15 (78,9%)	
Estadio			
IIIB	15 (53,6%)	8 (42,1%)	0,55
IV	13 (46,4%)	11 (57,9%)	
Karnofsky			
≤ 70%	13 (46,4%)	8 (42,1%)	0,99
> 70%	15 (53,6%)	11 (57,9%)	
Perda de peso			
< 10%	8 (28,6%)	9 (47,4%)	0,35
≥ 10%	20 (71,4%)	10 (52,6%)	
Resposta à quimioterapia			
Sim	8 (28,6%)	8 (42,1%)	0,36
Não	20 (71,4%)	11 (57,9%)	

* Probabilidade bicaudal associada ao teste exato de Fisher.

Tabela 6. Características demográficas e clínicas de 51 pacientes com adenocarcinoma pulmonar segundo a expressão imunohistoquímica da MMP-9.

	Expressão da MMP-9		Valor P *
	< 80%	≥ 80%	
Idade			
< 65 anos	22 (66,7%)	13 (72,2%)	0,76
≥ 65 anos	11 (33,3%)	5 (27,8%)	
Gênero			
Masculino	22 (66,7%)	10 (55,6%)	0,54
Feminino	11 (33,3%)	8 (44,4%)	
Histologia			
Bronquioloalveolar	6 (18,2%)	-	0,07
Outro padrão	27 (81,8%)	18 (100,0%)	
Estadio			
IIIB	14 (42,4%)	10 (55,6%)	0,39
IV	19 (57,6%)	8 (44,4%)	
Karnofsky			
≤ 70%	17 (51,5%)	7 (38,9%)	0,55
> 70%	16 (48,5%)	11 (61,1%)	
Perda de peso			
< 10%	15 (45,5%)	4 (22,2%)	0,13
≥ 10%	18 (54,5%)	14 (77,8%)	
Resposta à quimioterapia			
Sim	9 (27,3%)	7 (38,9%)	0,52
Não	24 (72,7%)	11 (61,1%)	

* Probabilidade bicaudal associada ao teste exato de Fisher.

Além da expressão de TTF-1 e MMP-9, apenas a capacidade funcional foi fator prognóstico para sobrevida na análise univariada (Tabelas 7 e 8). Curvas de sobrevida são apresentadas para capacidade funcional (Figuras 3 e 4), expressão do TTF-1 (Figuras 5 e 6) e expressão da MMP-9 (Figuras 7 e 8).

Tabela 7. Análise de sobrevida univariada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.

Característica	β	Erro Padrão	Valor-p *
Gênero	-0,124	0,334	0,709
Histologia	-0,951	0,609	0,119
Escala de Karnofsky	-0,038	0,014	0,007
Estadio clínico	0,008	0,322	0,980
Tosse	-0,169	0,327	0,606
Hemoptise	-0,473	0,485	0,329
Dor torácica	0,611	0,340	0,073
Dispneia	0,495	0,371	0,181
Emagrecimento	0,526	0,331	0,113
Resposta à quimioterapia	-0,335	0,339	0,323
Idade	-0,016	0,017	0,353

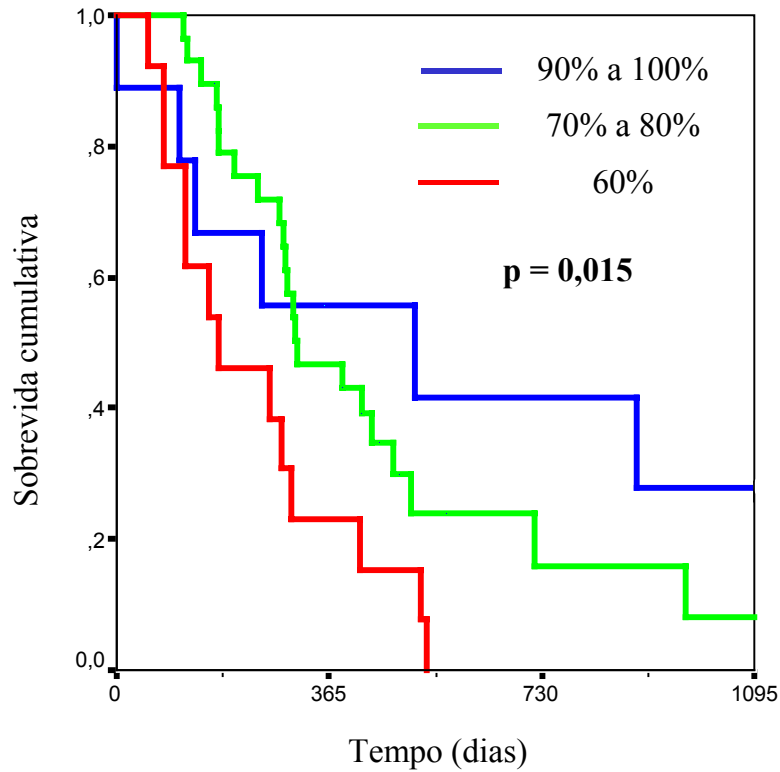
* Teste de Wald, valores-p bicaudais.

Tabela 8. Estimativas pontuais de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma pulmonar segundo capacidade funcional (escala de Karnofsky) e expressão de TTF-1 e MMP-9.

Fator	Número de Pacientes	Sobrevida			Valor-p *
		Mediana (semanas)	1 ano (%)	2 anos (%)	
Escala de Karnofsky					0,015
60%	13	25,0	23	-	
70% a 80%	29	44,1	43	16	
90% a 100%	9	73,3	56	42	
Expressão do TTF-1					0,004
≥ 40%	19	73,3	79	43	
< 40%	28	37,4	24	9	
Expressão da MMP-9					0,017
≥ 80%	18	19,3	22	7	
< 80%	33	59,7	57	34	

* Método de Kaplan-Meier; probabilidades associadas ao teste de logrank

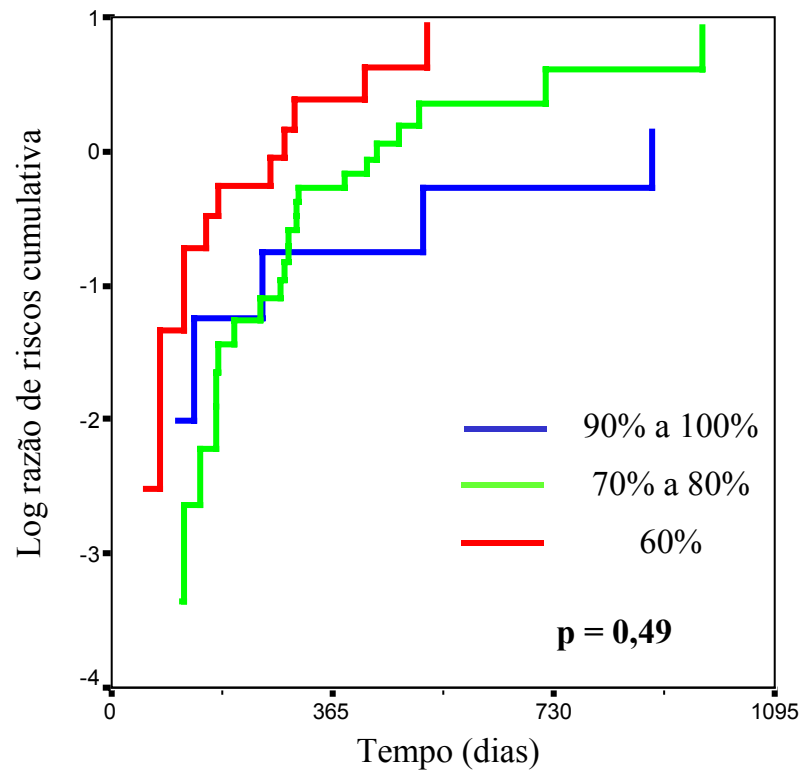
Figura 3: Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier segundo a capacidade funcional (escala de Karnofsky).



Nota: Comparação pelo teste logrank

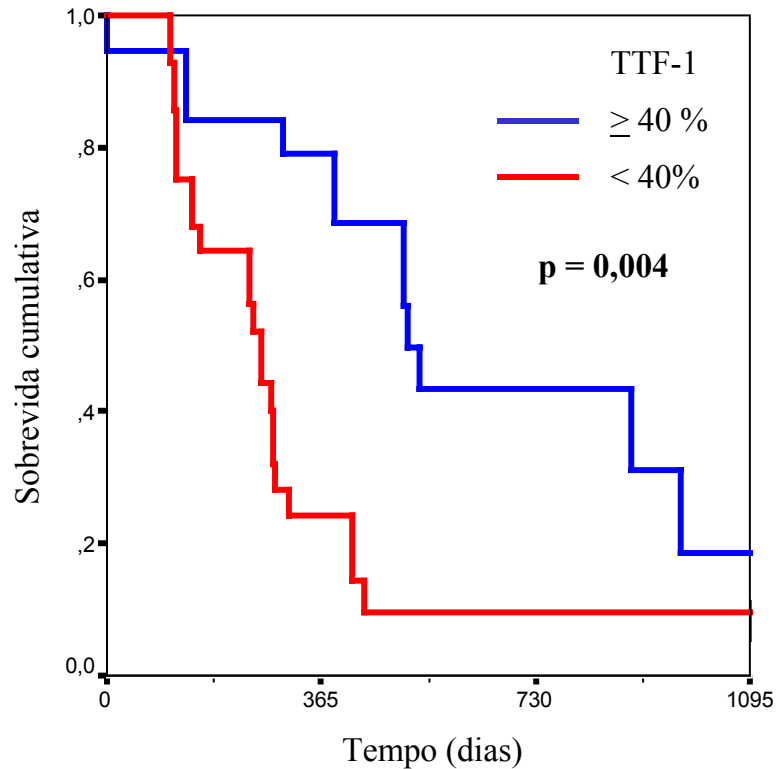
Não houve violação do princípio de proporcionalidade do risco ao longo do tempo para os estratos de capacidade funcional (Figura 4).

Figura 4: Avaliação do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo a capacidade funcional (escala de Karnofsky).



Nota: Avaliação dos coeficientes de regressão tempo-dependente pelo teste de Wald.

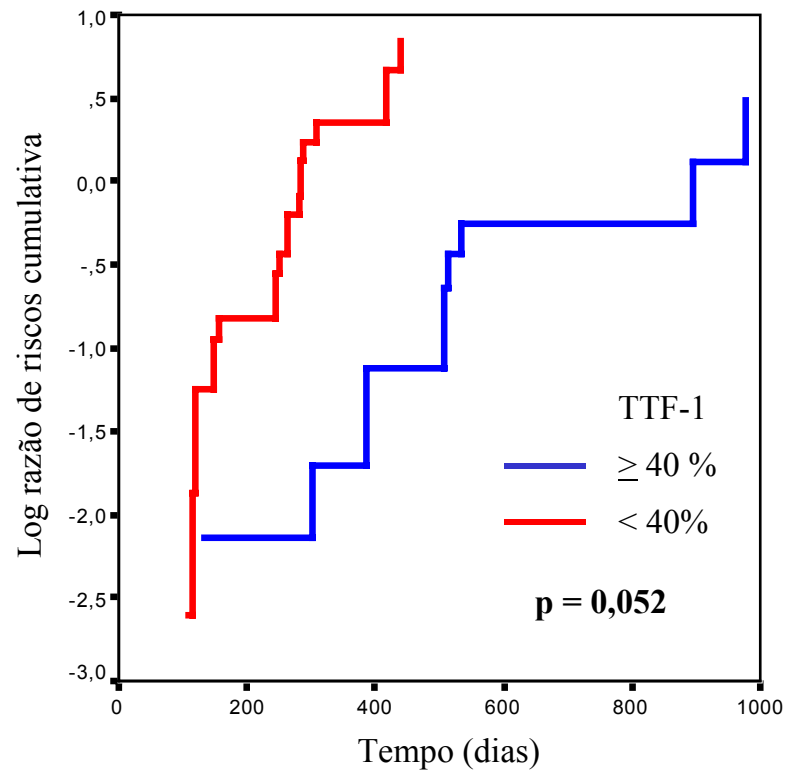
Figura 5: Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier segundo a expressão do TTF-1.



Nota: Comparação pelo teste logrank

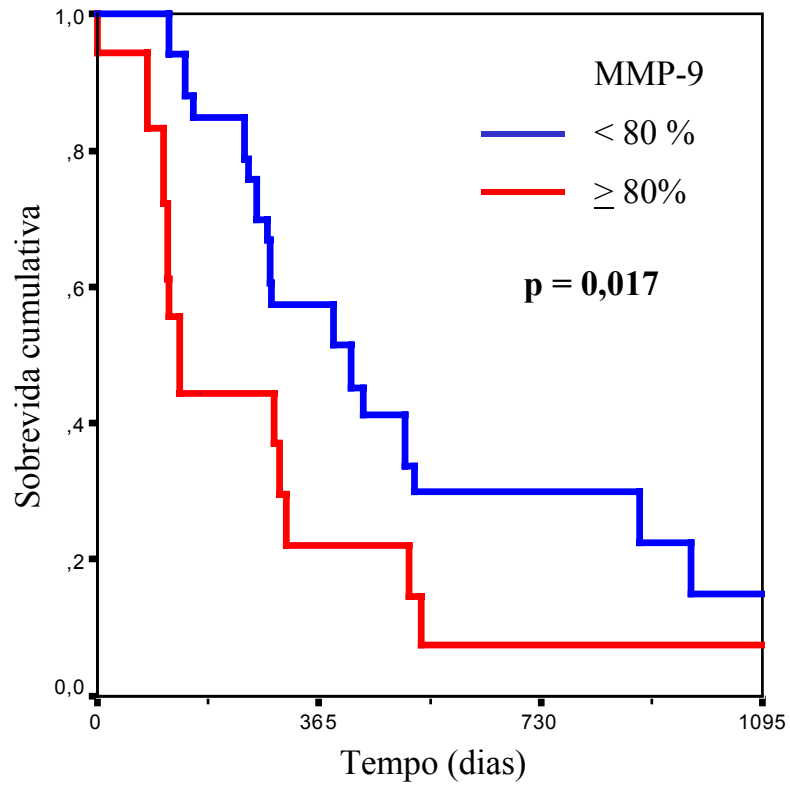
O teste de Wald para o efeito de interação entre o tempo de seguimento e o risco associado à expressão dos marcadores TTF-1 ($W = 3,78$; $p = 0,052$) e MMP-9 ($W = 2,77$; $p = 0,096$) também não foi significativo. No entanto, como o poder estatístico deste teste foi limitado pelo número de pacientes no estudo e os gráficos log-log sugerem violação do pressuposto de proporcionalidade de riscos (Figuras 6 e 8), a análise subsequente por regressão de Cox incluiu termos de interação entre os marcadores biológicos e uma variável tempo-dependente, representando o período de observação de cada paciente no estudo.

Figura 6: Avaliação do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo a expressão do TTF-1.



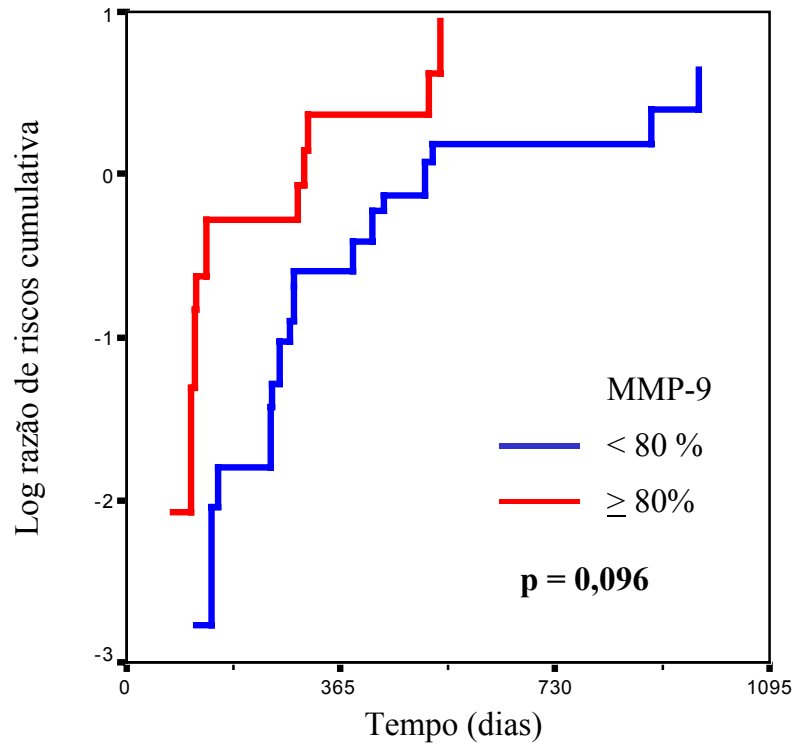
Nota: Avaliação dos coeficientes de regressão tempo-dependente pelo teste de Wald.

Figura 7: Curvas de sobrevivida pelo método de Kaplan-Meier segundo a expressão da MMP-9.



Nota: Comparação pelo teste de logrank

Figura 8: Avaliação do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo a expressão da MMP-9.



Nota: Avaliação dos coeficientes de regressão tempo-dependente pelo teste de Wald.

A análise multivariada de sobrevida permitiu encontrar três fatores preditivos independentes para tempo de sobrevida (Tabela 9), a saber: capacidade funcional, como medida pela escala de Karnofsky (HR=0,97; IC 95%: 0,94 a 0,99); expressão do TTF-1 \geq 40% (HR= 0,25; IC 95%: 0,11 a 0,57); e expressão da MMP-9 \geq 80% (HR=2,82; IC 95%: 1,30 a 6,08).

Tabela 9. Modelo de riscos proporcionais de Cox para predição do tempo de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma pulmonar avançado.

Fator	β	Erro-padrão	χ^2 Wald	Grau de Liberdade	Valor-p
Escore de Karnofsky	-0,032	0,013	5,739	1	0,017
TTF-1	-1,362	0,410	11,016	1	0,001
MMP-9	1,036	0,392	6,969	1	0,008

Modelos obtidos por regressão de Cox contendo um ou dois destes fatores foram calculados para a comparação estatística de seus desempenhos prognósticos (Tabela 10). O modelo ajustado para influência do tempo de observação contendo os três fatores descreveu melhor o tempo de sobrevida dos pacientes estudados.

Tabela 10. Estatística de verossimilhança ('log likelihood' – LL) dos modelos prognósticos possíveis (comparados ao modelo nulo) para pacientes com adenocarcinoma pulmonar.

Modelo	-2 LL	χ^2	Grau de Liberdade	Valor-p
M	253,29	4,59	1	0,032
K	251,36	5,75	1	0,016
T	217,68	9,41	1	0,002
K + M	246,01	12,52	2	0,0019
K+ T	212,46	14,12	2	0,0008
T + M	212,45	14,38	2	0,0007
K + T + M	206,31	21,02	3	0,00010
K + T + M *	199,43	20,44	3	0,00014

Nota: M: expressão da MMP-9; T: expressão do TTF-1;
 K: escore de Karnofsky.
 * Modelo final ajustado para riscos não-proporcionais.

A informação prognóstica oferecida pelo estudo dos marcadores imunohistoquímicos foi agregada por consolidação conjuntiva em um indicador de risco para mortalidade (Tabela 11; Figuras 9 e 10).

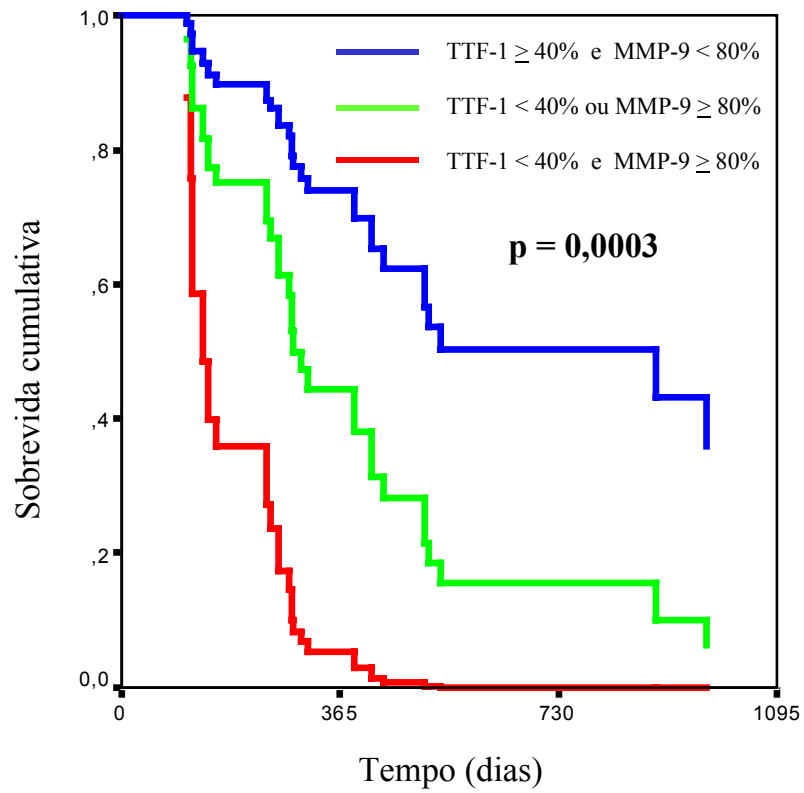
Tabela 11. Número de pacientes, sobrevida mediana e pontual segundo grupo prognóstico para 47 pacientes com adenocarcinoma de pulmão avançado ou metastático.

Expressão do marcador		Número de Pacientes	Sobrevida *				Categoria de Risco
TTF-1	MMP-9		Mediana (semanas)	6 meses (%)	1 ano (%)	2 anos (%)	
≥ 40%	< 80%	12	127,6	100	100	62	Baixo
≥ 40%	≥ 80%	7	43,0	57	43	14	Intermediário
< 40%	< 80%	20	37,4	75	30	12	Intermediário
< 40%	≥ 80%	8	16,4	37	-	-	Alto

* Método de Kaplan-Meier; teste logrank para tendência: $\chi^2 = 11,32$; $p = 0,008$.

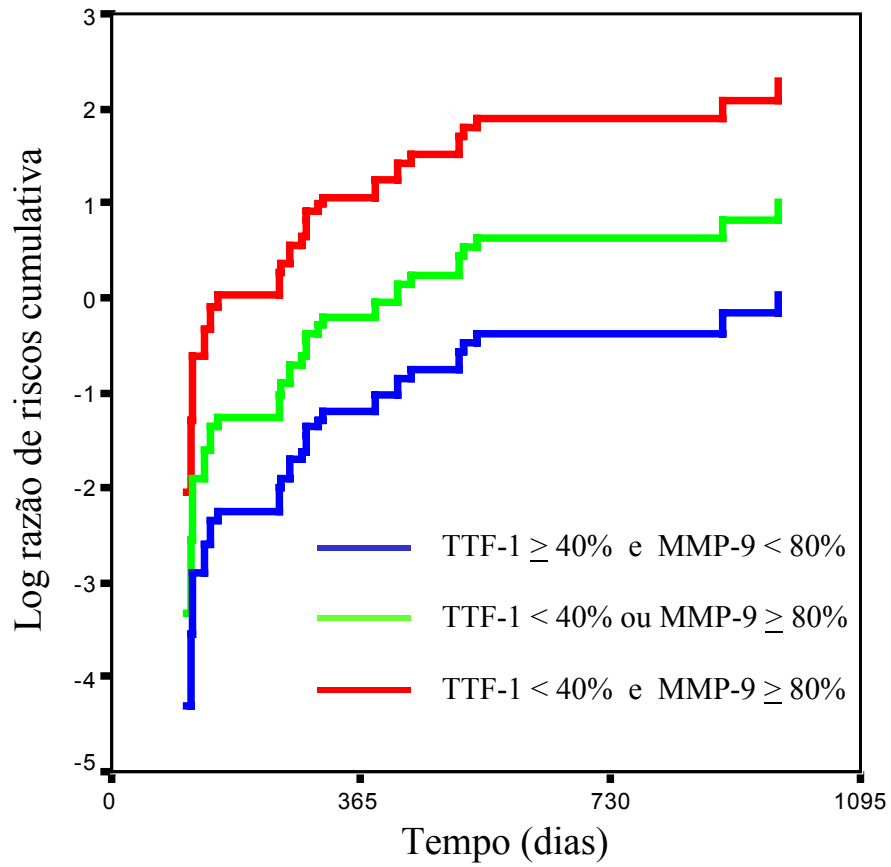
Os pacientes foram estratificados em três grupos, com diferenças de mortalidade clinicamente significativas: baixo risco - sobrevida mediana, em 1 e 2 anos de 127,6 semanas, 100% e 62%, respectivamente; risco intermediário - sobrevida mediana de 39 semanas, 33% em 1 ano e 12% em 2 anos; e alto risco, sobrevida mediana de 16,4 semanas e nenhum sobrevivente em 1 ano.

Figura 9: Curvas de risco pelo modelo de Cox para expressão de TTF-1 e MMP-9.



Nota: Comparação pelo teste de Wald

Figura 10: Demonstração gráfica do pressuposto de riscos proporcionais no tempo segundo os estratos de expressão de TTF-1 e MMP-9.



4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O comportamento biológico do câncer é dependente de múltiplas características fenotípicas - proliferação celular autônoma, resistência à apoptose, indução de angiogênese, invasão tissular, disseminação metatática e evasão da vigilância imunológica (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Estas características são determinadas por eventos cromossômicos complexos, interdependentes, ainda pouco conhecidos, assim como por extensa interação entre a célula neoplásica e seu micro-ambiente tissular (CHAMMAS & BRENTANI, 2002). Conhecer o prognóstico de um paciente com câncer é, pois, uma tarefa difícil, que envolve a identificação de uma matriz representativa de dados sobre o tecido tumoral e o estudo da forma com que estas informações se relacionam à história clínica da doença. No presente estudo foi demonstrado que a avaliação IHQ da expressão da MMP-9 e TTF-1, independente da capacidade funcional medida pela escala de Karnofsky, pode permitir a identificação de subgrupos de pacientes com adenocarcinoma avançado ou metastático que apresentam prognósticos distintos quando tratados com quimioterapia baseada em derivados da platina.

Aqui foi observado que a capacidade funcional como medida pela escala de Karnofsky foi o fator clínico prognóstico mais importante, havendo uma diminuição de 3% no risco de óbito a cada nível acima de 60%. Desde sua proposição (KARNOFSKY & BURCHENAL, 1949), e mesmo antes de haver uma demonstração cabal de que o uso de agentes citotóxicos fosse útil no tratamento paliativo do câncer de pulmão (STANLEY, 1980), esta medida funcional, simples e prática, reconhecidamente influencia as atitudes terapêuticas em cancerologia e por isso quase sempre tem sido identificada como importante parâmetro em modelos prognósticos no câncer de pulmão (BERGHMANS et al., 2004; MARTINS & PEREIRA, 1999; YOUNES et al., 2004).

A expressão da MMP-9 aqui encontrada foi ampla, com elevada proporção de células tumorais marcadas. A maioria dos espécimes analisados foi obtida por broncoscopia e provavelmente representavam as porções periféricas, invasivas do tumor, onde a atividade de degradação da matriz extracelular em geral se opera mais ativamente (CHAMMAS & BRENTANI, 2002; COX et al., 2001a). O risco de óbito entre pacientes nos quais havia expressão aumentada da enzima foi aumentado em 182%. Esta informação estende, para o cenário da doença avançada, observações feitas em nosso meio sobre o pior prognóstico associado à expressão da MMP-9 no adenocarcinoma de pulmão localizado (MINAMOTO et al., 2003; PINTO et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2004b), assim como por vários autores no CPCNP (COX et al., 2001a; COX et al., 2000; COX et al., 2001b; FUJISE et al., 2000; KODATE et al., 1997; SHOU et al., 2001; SIENEL et al., 2003; SWINSON et al., 2004a; SWINSON et al., 2004b).

O papel da expressão IHQ da MMP-9 tem merecido destaque nos estudos sobre o valor prognóstico de marcadores biológicos no CPCNP conduzidos pelo Laboratório de Patologia Pulmonar da FMUSP. Avaliando espécimes de 152 pacientes com adenocarcinoma de pulmão completamente ressecado, sem envolvimento linfonodal, PINTO et al. (2003) mostraram que a detecção da MMP-9 oferecia importante informação prognóstica nesta doença. A expressão da MMP-9 estava relacionada ao estadiamento patológico da doença, particularmente o estadio T, além do volume nuclear, expressão de p53 e densidade vascular. Na ocasião, uma análise multivariada demonstrou que além do estadio T apenas expressão da MMP-9 apresentava valor prognóstico, havendo uma diminuição de 14% na probabilidade de sobrevida a cada acréscimo de 1% na expressão da MMP-9. Partindo do princípio que a propensão à invasão e metástase é uma manifestação tardia na progressão do câncer de pulmão, MINAMOTO et al. (2003) avaliaram a relação entre características das células neoplásicas e do seu micro-ambiente (proteína p53, regiões argirofílicas organizadoras

nucleolares, densidade vascular e MMP-9) em 80 espécimes cirúrgicos de câncer de pulmão não-pequenas células, dos quais em 31 pacientes havia material de biópsia correspondente de suas metástases (oito correspondentes a adenocarcinoma). A expressão da MMP-9 foi maior em tumores metastáticos, independente do estádio T inicial. Recentemente, YAMAGUCHI et al. (2004b) observaram em uma série cirúrgica de pacientes com adenocarcinoma pulmonar que a expressão aumentada da MMP-9 conferia um pior prognóstico. A sobrevivência mediana entre pacientes com tumores cuja expressão do marcador se encontrava acima da mediana daquela casuística (12%) foi de apenas 11 meses, enquanto o tempo mediano de sobrevivência após a cirurgia entre os demais foi de 63 meses. Em um modelo prognóstico que incorporou estádio clínico, variante histológica papilar na classificação de Noguchi e expressão de ciclooxigenase 2, o risco de óbito aumentou 9% a cada acréscimo de 1% na proporção de células tumorais marcadas para MMP-9.

No presente estudo a marcação tumoral para TTF-1 em proporção igual ou acima de 40% identificou um subgrupo de pacientes com melhor prognóstico: risco de óbito quatro vezes inferior aos demais, quando ajustado para capacidade funcional e expressão da MMP-9. Vantagem similar havia sido notada entre 126 pacientes com CPCNP ressecável (TAN et al., 2003), onde foi verificada uma redução de risco da ordem de 50% para a expressão do TTF-1 acima de 5%, efeito este devidamente ajustado para diferenças de estadiamento patológico e capacidade funcional. Outros autores avaliaram o papel prognóstico deste marcador no CPCNP e encontraram resultados divergentes, sumarizados no Quadro 2.

Os resultados discrepantes encontrados possivelmente decorrem da elaboração de modelos probabilísticos a partir de informações distintas, nem sempre completas. Nota-se, sobretudo, variações na composição da população estudada, nos métodos IHQ (anticorpos, protocolos de recuperação antigênica e limiares de classificação), nos dados clínicos e nas formas de análise estatística. Em muitos casos, a influência conhecida de fatores de risco tais

como capacidade funcional e estadió clínico não foram ponderadas nos modelos prognósticos obtidos.

Quadro 2. Estudos sobre o valor prognóstico da expressão imunohistoquímica do TTF-1 no carcinoma pulmonar de células não-pequenas

Referência	Casuística		Estadio	Comentários
	n	Adenocarcinoma		
Puglisi et al. (1999)	88	32%	I a IIIA	Expressão elevada do TTF-1 conferiu pior prognóstico nos casos de carcinoma epidermóide (teste logrank, P = 0,009)
Pelosi et al. (2001)	222	44%	I	Sem relação entre expressão do TTF-1 e sobrevida; tendência a melhor prognóstico para tumores com marcador detectável em mais de 75% das células.
Haque et al. (2002)	57	49%	I a IIIA	Maior sobrevida para pacientes com mais de 90% de expressão tumoral do TTF-1 (teste logrank, P = 0,03).
Yatabe et al. (2002)	64	100%	I a IIIA	Benefício em sobrevida para expressão do TTF-1 na análise inicial (teste logrank, P = 0,02), não mantido na análise multivariada (P = 0,26).
Tan et al. (2003)	140	54%	I a IIIA	Maior sobrevida para pacientes com expressão tumoral do TTF-1 (teste logrank, P = 0,0067).
Myong et al. (2003)	65	42%	I a IIIA	Tendência (teste logrank, P = 0,095) a maior sobrevida para pacientes com expressão tumoral do TTF-1.
Stenhouse et al. (2004)	165	77%	I a IIIA	Sem relação entre expressão do TTF-1 e sobrevida.
Saad et al. (2004)	100	100%	I	Maior sobrevida para pacientes com expressão tumoral do TTF-1 (teste logrank, P = 0,001); benefício ausente nos casos de carcinoma bronquioloalveolar.

Há limitações no estudo aqui apresentado, muitas delas decorrentes da sua natureza observacional e retrospectiva. Apesar de que o padrão de tratamento e seguimento dos pacientes era adequado à época, ele não reproduz as condutas atuais no tratamento paliativo no CPCNP. O número limitado de casos disponíveis para análise, em parte por indisponibilidade de espécime para estudo histopatológico, certamente reduziu o poder estatístico do estudo. Modelos probabilísticos obtidos por regressão de Cox requerem um mínimo de cinco a dez eventos por variável explanatória incluída na equação final para que se possa minimizar a chance de violação do princípio de riscos proporcionais e para se contornar dificuldades advindas de possível multicolinearidade entre as variáveis independentes (KLEIN & MOESCHBERGER, 1997). Com maior número de pacientes talvez fosse possível ainda um refinamento das estimativas de risco associado aos marcadores biológicos, pela incorporação de informações adicionais ao modelo prognóstico final. Um outro aspecto vital de uma predição é considerar se o modelo estatístico derivado de uma análise de um banco de dados original é aplicável a pacientes similares em outro local. Uma nova série de pacientes com adenocarcinoma de pulmão será estudada com a finalidade precípua de se verificar se a aplicação do modelo aqui obtido é generalizável.

A maioria dos espécimes obtidos por biópsia transbrônquica foi exígua, não permitindo uma avaliação mais extensa do padrão histológico do adenocarcinoma. Estes espécimes não necessariamente podem ser tomados como amostras aleatórias representativas do padrão de expressão tumoral de um dado marcador biológico. No caso da MMP-9, sabe-se que sua expressão é maior nas bordas do tumor (COX et al., 2001a) e resultados negativos vistos na biópsia obtida ao diagnóstico podem não ser confirmado na análise de espécimes mais representativos, obtidos após a cirurgia (FERRIGAN & WALLACE, 2004).

Diversamente do que ocorre com a expressão aumentada da MMP-9, cuja associação com maior risco de invasão e metástase oferece uma explicação adequada para o seu valor

prognóstico no câncer, pouco se conhece sobre a ação biológica do TTF-1 na carcinogênese pulmonar. É possível este marcador apenas identifique tumores de ontogênese distinta, portanto de comportamento diverso (BORCZUK et al., 2004). No entanto, uma outra hipótese atrativa para o mau prognóstico dos pacientes com tumores de baixa marcação para TTF-1 pode ser aventada. A expressão deste gene pode estar reprimida por uma cadeia de eventos biomoleculares, responsáveis também por um comportamento mais agressivo. Neste caso, a via de sinalização Ras poderia estar implicada.

Os proto-oncogenes *ras* codificam proteínas de 21 kDa (p21), associadas à porção interna da membrana celular, que funcionam alternando entre uma forma ativa ou inativa. Em sua forma ativa, que decorre do acoplamento de um ligante a um receptor externo ou de ativação constitutiva, as proteínas Ras ativam várias cadeias efetoras, como as serina/treonina-quinases da família Raf (Raf-1, Raf-A e Raf-B), Rac, Rho e a fosfatidilinositol-3-quinase, que são mediadores de importantes funções celulares, que incluem o controle da proliferação, organização do citoesqueleto, e regulação da sobrevivência a agressões externas (RODENHUIS & SLEBOS, 1990). Especificamente, a interação entre Ras e Raf produz ativação da via de sinalização por proteinoquinases mitógeno-ativadas (MAPK) e quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), resultando na fosforilação de alvos citoplasmáticos e nucleares que modulam a expressão gênica (CAMPBELL, 1998). Mutações nos códons 12, 13 ou 61 de um dos quatro genes *ras*, *N-ras*, *H-ras*, *Ka-ras* e *Kb-ras*, convertem-nos em oncogenes ativos, resultando em contínuo estímulo ao crescimento celular. Mutações *K-ras* são encontradas em um terço dos adenocarcinomas pulmonares, mas raramente em outros tipos histológicos de CPCNP (VACHTENHEIM, 1997), sendo reconhecidas como fator de pior prognóstico, em termos de risco de recidiva, sobrevida global e mortalidade específica por câncer (HUNCHAREK et al., 1999; SLEBOS et al., 1990). Assim, de maneira análoga à que ocorre em células do epitélio tireoideano, onde a expressão de Ras ativado resulta em

supressão da expressão do gene TTF-1 por ativação da via Raf/MAPK/ERK, particularmente quando há mutação *K-ras* (FRANCIS-LANG et al., 1992; MISSERO et al., 2000), é possível que a menor marcação para TTF-1, observada nos casos de adenocarcinoma pulmonar com pior prognóstico, represente uma evidência indireta de ganho de função da via de sinalização Ras. Se esta hipótese for confirmada por experimentos adicionais, a avaliação da expressão do TTF-1 poderá ser útil na seleção de pacientes para tratamento com fármacos dirigidos para tumores com ativação constitutiva da via Ras, como inibidores da farnesiltransferase e oligonucleotídeos complementares (GRIDELLI et al., 2003).

Destacamos do ponto de vista clínico que a avaliação da expressão de TTF-1 e MMP-9 por IHQ no adenocarcinoma pulmonar pode permitir a identificação de subgrupos de pacientes com prognóstico muito variável. Assim, heterogeneidade quanto à distribuição destas características pode ser uma importante fonte de viés na interpretação dos resultados de estudos terapêuticos. Considerando a ubiquidade do método diagnóstico aqui empregado os pesquisadores deverão considerar no desenho de futuros ensaios clínicos a estratificação por estes marcadores, idealmente quando da inclusão do paciente, se estes resultados forem validados.

O câncer de pulmão avançado continua sendo uma doença letal, apesar do progresso recente na quimioterapia antineoplásica, e esforços no sentido de coibir o tabagismo permanecem como mandatórios para os profissionais de saúde e toda a sociedade, uma vez ser este o modo mais simples e efetivo de prevenção primária desta doença. A continuar o crescimento recente do conhecimento sobre fatores prognósticos (BRUNDAGE et al., 2002), é de se esperar que no futuro haja uma maior compreensão sobre a fisiopatologia do câncer de pulmão, fundamento necessário à uma terapêutica mais racional. Só então praticaremos a medicina que julgamos ideal, empregando medidas inovadoras que oxalá permitam remover "o espírito da doença" antes mesmo que ele tome forma.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- 5.1. A intensidade da expressão do TTF-1 apresentava fraca correlação positiva com a presença de componente bronquioloalveolar e com a ausência de dispnéia.
- 5.2. A intensidade da expressão da MMP-9 foi independente dos demográficos, clínicos e biológicos estudados.
- 5.3. Os valores correspondentes ao 6º decil da distribuição do escore de expressão dos marcadores TTF-1 (40%) e MMP-9 (80%) permitiram a dicotomização dos pacientes em subgrupos prognósticos distintos.
- 5.4. A informação sobre a expressão IHQ de TTF-1 e MMP-9 permitiu de modo independente a estratificação dos pacientes em três grupos de risco para mortalidade, com probabilidades de sobrevida significativamente diferentes: baixo risco (TTF-1 \geq 40% e MMP-9 $<$ 80%), com sobrevida mediana de 127,6 semanas, 100% em 1 ano e 62% em 2 anos; risco intermediário (TTF-1 $<$ 40% ou MMP-9 \geq 80%), com sobrevida mediana de 39 semanas, 33% em 1 ano e 12% em 2 anos; e alto risco (TTF-1 $<$ 40% e MMP-9 \geq 80%), com sobrevida mediana de 16,4 semanas e nenhum sobrevivente em 1 ano.

REFERÊNCIAS

- ANELLI, A. Tratamento neoadjuvante e adjuvante em câncer de pulmão. In: CUKIER, A., NAKATANI, J. and MORRONE, N., ed. **Pneumologia: Atualização e Reciclagem**. São Paulo, Atheneu, 1998, p.401-5.
- ANGELETTI, C. A.; LUCCHI, M.; FONTANINI, G.; MUSSI, A.; CHELLA, A.; RIBECHINI, A.; VIGNATI, S.; BEVILACQUA, G. Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2). Impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence. **Cancer**, v.78, p.409-15, 1996.
- ARDIZZONI, A.; ANTONELLI, G.; GROSSI, F.; TIXI, L.; CAFFERATA, M.; ROSSO, R. The combination of etoposide and cisplatin in non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Ann Oncol**, v.10 (supl.5), p.S13-7, 1999.
- ARRIAGADA, R.; BERGMAN, B.; DUNANT, A.; LE CHEVALIER, T.; PIGNON, J. P.; VANSTEENKISTE, J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med**, v.350, p.351-60, 2004.
- BEER, D. G.; KARDIA, S. L.; HUANG, C. C.; GIORDANO, T. J.; LEVIN, A. M.; MISEK, D. E.; LIN, L.; CHEN, G.; GHARIB, T. G.; THOMAS, D. G.; LIZYNESS, M. L.; KUICK, R.; HAYASAKA, S.; TAYLOR, J. M.; IANNETTONI, M. D.; ORRINGER, M. B.; HANASH, S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nat Med**, v.8, p.816-24, 2002.
- BERGHMANS, T.; LAFITTE, J. J.; THIRIAUX, J.; VANHOUTTE, P.; LECOMTE, J.; EFREMIDIS, A.; KOUMAKIS, G.; GINER, V.; RICHEZ, M.; CORHAY, J. L.; WACKENIER, P.; LOTHAIRE, P.; MOMMEN, P.; NINANE, V.; SCULIER, J. P. Survival is better predicted with a new classification of stage III unresectable non-

small cell lung carcinoma treated by chemotherapy and radiotherapy. **Lung Cancer**, v.45, p.339-48, 2004.

BHATTACHARJEE, A.; RICHARDS, W. G.; STAUNTON, J.; LI, C.; MONTI, S.; VASA, P.; LADD, C.; BEHESHTI, J.; BUENO, R.; GILLETTE, M.; LODA, M.; WEBER, G.; MARK, E. J.; LANDER, E. S.; WONG, W.; JOHNSON, B. E.; GOLUB, T. R.; SUGARBAKER, D. J.; MEYERSON, M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, p.13790-5, 2001.

BINGLE, C. D. Thyroid transcription factor-1. **Int J Biochem Cell Biol**, v.29, p.1471-3, 1997.

BORCZUK, A. C.; ASSAAD, A. M.; WANG, L. Q.; WALTER, K. L.; POWELL, C. A. Non-small cell lung cancer molecular profiles are associated with lung development. **Chest**, v.125(Supl.5), p.115S-6S, 2004.

BRAMBILLA, E.; TRAVIS, W. D.; COLBY, T. V.; CORRIN, B.; SHIMOSATO, Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. **Eur Respir J**, v.18, p.1059-68, 2001.

BRUNDAGE, M. D.; DAVIES, D.; MACKILLOP, W. J. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. **Chest**, v.122, p.1037-57, 2002.

CAMILLERI-BROET, S.; ALIFANO, M.; MORCOS, M.; COMPERAT, E.; MAGDELEINAT, P.; MARMEY, B.; MOLINA, T. J.; REGNARD, J. F.; AUDOUIN, J. Peroperative frozen section analysis of TTF-1 antigen expression. **J Clin Pathol**, v.57, p.98-100, 2004.

CAMPBELL, S. L.; KHOSRAVI-FAR, R.; ROSSMAN, K. L.; CLARK, G. J.; DER, C. J. Increasing complexity of Ras signaling. **Oncogene**, v.17, p.1395-413, 1998.

- CARVALHO, H. A.; SALDIVA, P. H.; TAKAGAKI, T. Y.; CAPELOZZI, V. L. Stereological estimates of the nuclear/cytoplasmic ratio and star volume on fibreoptic biopsies are of prognostic value for survival in a preliminary study of advanced squamous cell carcinoma of the lung. **Histopathology**, v.31, p.420-9, 1997.
- CHAMBERS, A. F.; MATRISIAN, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J Natl Cancer Inst**, v.89, p.1260-70, 1997.
- CHAMMAS, R.; BRENTANI, R. R. Cell-matrix interactions. In: BERTINO, J. R., ed. **Encyclopedia of Cancer**. San Diego, Academic Press, 2002, v.2, p.405-13.
- CHANDRACHUD, L. M.; PENDLETON, N.; CHISHOLM, D. M.; HORAN, M. A.; SCHOR, A. M. Relationship between vascularity, age and survival in non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v.76, p.1367-75, 1997.
- COX, G.; JONES, J. L.; ANDI, A.; WALLER, D. A.; O'BYRNE, K. J. A biological staging model for operable non-small cell lung cancer. **Thorax**, v.56, p.561-6, 2001a.
- COX, G.; JONES, J. L.; O'BYRNE, K. J. Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, v.6, p.2349-55, 2000.
- COX, G.; LOUISE JONES, J.; ANDI, A.; ABRAMS, K. R.; O'BYRNE, K. J. Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.34, p.417-26, 2001b.
- DEMARCHI, L. M.; REIS, M. M.; PALOMINO, S. A.; FARHAT, C.; TAKAGAKI, T. Y.; BEYRUTI, R.; SALDIVA, P. H.; CAPELOZZI, V. L. Prognostic values of stromal proportion and PCNA, Ki-67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. **Mod Pathol**, v.13, p.511-20, 2000.

- DI LORETO, C.; DI LAURO, V.; PUGLISI, F.; DAMANTE, G.; FABBRO, D.; BELTRAMI, C. A. Immunocytochemical expression of tissue specific transcription factor-1 in lung carcinoma. **J Clin Pathol**, v.50, p.30-2, 1997.
- DUARTE, I. G.; BUFKIN, B. L.; PENNINGTON, M. F.; GAL, A. A.; COHEN, C.; KOSINSKI, A. S.; MANSOUR, K. A.; MILLER, J. I. Angiogenesis as a predictor of survival after surgical resection for stage I non-small-cell lung cancer. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.115, p.652-8, 1998.
- ENDO, H.; TOMIDA, S.; YATABE, Y.; KONISHI, H.; OSADA, H.; TAJIMA, K.; KUWANO, H.; TAKAHASHI, T.; MITSUDOMI, T. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **J Clin Oncol**, v.22, p.811-9, 2004.
- FABBRO, D.; DI LORETO, C.; STAMERRA, O.; BELTRAMI, C. A.; LONIGRO, R.; DAMANTE, G. TTF-1 gene expression in human lung tumours. **Eur J Cancer**, v.32A, p.512-7, 1996.
- FEINSTEIN, A. R.; WELLS, C. K. A clinical-severity staging system for patients with lung cancer. **Medicine (Baltimore)**, v.69, p.1-33, 1990.
- FERRIGAN, L.; WALLACE, W. A. Predicting non-small cell lung cancer expression of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase 9 from immunohistochemical staining of diagnostic biopsy samples. **Eur J Cancer**, v.40, p.1589-92, 2004.
- FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst**, v.82, p.4-6, 1990.

- FRANCIS-LANG, H.; ZANNINI, M.; DE FELICE, M.; BERLINGIERI, M. T.; FUSCO, A.; DI LAURO, R. Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells. **Mol Cell Biol**, v.12, p.5793-800, 1992.
- FUJISE, N.; NANASHIM, A.; TANIGUCHI, Y.; MATSUO, S.; HATANO, K.; MATSUMOTO, Y.; TAGAWA, Y.; AYABE, H. Prognostic impact of cathepsin B and matrix metalloproteinase-9 in pulmonary adenocarcinomas by immunohistochemical study. **Lung Cancer**, v.27, p.19-26, 2000.
- GIATROMANOLAKI, A. Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. **Anticancer Res**, v.21, p.4373-82, 2001.
- GORDON, G. J.; RICHARDS, W. G.; SUGARBAKER, D. J.; JAKLITSCH, M. T.; BUENO, R. A prognostic test for adenocarcinoma of the lung from gene expression profiling data. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.12, p.905-10, 2003.
- GOTO, K.; YOKOSE, T.; KODAMA, T.; NAGAI, K.; NISHIWAKI, Y.; ANDO, M.; MUKAI, K.; OCHIAI, A. Detection of early invasion on the basis of basement membrane destruction in small adenocarcinomas of the lung and its clinical implications. **Mod Pathol**, v.14, p.1237-45, 2001.
- GRIDELLI, C.; ROSSI, A.; MAIONE, P. Treatment of non-small-cell lung cancer: state of the art and development of new biologic agents. **Oncogene**, v.22, p.6629-38, 2003.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.
- HAQUE, A. K.; SYED, S.; LELE, S. M.; FREEMAN, D. H.; ADEGBOYEGA, P. A. Immunohistochemical study of thyroid transcription factor-1 and HER2/neu in non-small cell lung cancer: strong thyroid transcription factor-1 expression predicts better survival. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.10, p.103-9, 2002.

- HOTTA, K.; MATSUO, K.; UEOKA, H.; KIURA, K.; TABATA, M.; TANIMOTO, M. Addition of platinum compounds to a new agent in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a literature based meta-analysis of randomised trials. **Ann Oncol**, v.15, p.1782-1789, 2004a.
- HOTTA, K.; MATSUO, K.; UEOKA, H.; KIURA, K.; TABATA, M.; TANIMOTO, M. Role of adjuvant chemotherapy in patients with resected non-small-cell lung cancer: reappraisal with a meta-analysis of randomized controlled trials. **J Clin Oncol**, v.22, p.3860-7, 2004b.
- HUNCHAREK, M.; MUSCAT, J.; GESCHWIND, J. F. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. **Carcinogenesis**, v.20, p.1507-10, 1999.
- INOUE, K.; SATO, M.; FUJIMURA, S.; SAKURADA, A.; TAKAHASHI, S.; USUDA, K.; KONDO, T.; TANITA, T.; HANDA, M.; SAITO, Y.; SAGAWA, M. Prognostic assessment of 1310 patients with non-small-cell lung cancer who underwent complete resection from 1980 to 1993. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.116, p.407-11, 1998.
- JANSSEN-HEIJNEN, M. L.; COEBERGH, J. W. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. **Lung Cancer**, v.41, p.245-58, 2003.
- JANSSEN-HEIJNEN, M. L.; NAB, H. W.; VAN REEK, J.; VAN DER HEIJDEN, L. H.; SCHIPPER, R.; COEBERGH, J. W. Striking changes in smoking behaviour and lung cancer incidence by histological type in south-east Netherlands, 1960-1991. **Eur J Cancer**, v.31A, p.949-52, 1995.
- JEROME MARSON, V.; MAZIERES, J.; GROUSSARD, O.; GARCIA, O.; BERJAUD, J.; DAHAN, M.; CARLES, P.; DASTE, G. Expression of TTF-1 and cytokeratins in

primary and secondary epithelial lung tumours: correlation with histological type and grade. **Histopathology**, v.45, p.125-34, 2004.

KARNOFSKY, D. A.; BURCHENAL, J. H. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MACLEOD, C. M., ed. **Evaluation of chemotherapeutic agents**. New York, Columbia Univ Press, 1949, p.196.

KARNOFSKY, D. A.; MYERS, W. P.; PHILLIPS, R. Treatment of the inoperable pulmonary cancer, primary and metastatic. **Am J Surg**, v.89, p.526-37, 1955.

KLEIN, J. P.; MOESCHBERGER, M. L. **Survival analysis: techniques for censored and truncated data**. New York, Springer-Verlag, 1997, p.327-371.

KODATE, M.; KASAI, T.; HASHIMOTO, H.; YASUMOTO, K.; IWATA, Y.; MANABE, H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. **Pathol Int**, v.47, p.461-9, 1997.

KWIATKOWSKI, D. J.; HARPOLE, D. H., JR.; GODLESKI, J.; HERNDON, J. E., 2ND; SHIEH, D. B.; RICHARDS, W.; BLANCO, R.; XU, H. J.; STRAUSS, G. M.; SUGARBAKER, D. J. Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications. **J Clin Oncol**, v.16, p.2468-77, 1998.

LAU, S. K.; DESROCHERS, M. J.; LUTHRINGER, D. J. Expression of thyroid transcription factor-1, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in bronchioloalveolar carcinomas: an immunohistochemical evaluation of 67 cases. **Mod Pathol**, v.15, p.538-42, 2002a.

LAU, S. K.; LUTHRINGER, D. J.; EISEN, R. N. Thyroid transcription factor-1: a review. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.10, p.97-102, 2002b.

LILENBAUM, R. C.; LANGENBERG, P.; DICKERSIN, K. Single agent versus combination chemotherapy in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma: a meta-analysis of response, toxicity, and survival. **Cancer**, v.82, p.116-26, 1998.

- LUCCHI, M.; FONTANINI, G.; MUSSI, A.; VIGNATI, S.; RIBECHINI, A.; MENCONI, G. F.; BEVILACQUA, G.; ANGELETTI, C. A. Tumor angiogenesis and biologic markers in resected stage I NSCLC. **Eur J Cardiothorac Surg**, v.12, p.535-41, 1997.
- MARTINI, N.; BAINS, M. S.; BURT, M. E.; ZAKOWSKI, M. F.; MCCORMACK, P.; RUSCH, V. W.; GINSBERG, R. J. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.109, p.120-9, 1995.
- MARTINS, S. J.; PEREIRA, J. R. Clinical factors and prognosis in non-small cell lung cancer. **Am J Clin Oncol**, v.22, p.453-7, 1999.
- MINAMOTO, H.; ANTONANGELO, L.; DA SILVA, A. G.; GALLO, C. P.; DE ANDRADE E SILVA, F. B.; FENEZELIAN, S.; RODRIGUES, O. R.; JATENE, F.; SALDIVA, P.; CAPELOZZI, V. L. Tumour cell and stromal features in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. **Histopathology**, v.43, p.427-43, 2003.
- MISSERO, C.; PIRRO, M. T.; DI LAURO, R. Multiple ras downstream pathways mediate functional repression of the homeobox gene product TTF-1. **Mol Cell Biol**, v.20, p.2783-93, 2000.
- MORITA, T. A statistical study of lung cancer in the annual of pathological autopsy cases in Japan, from 1958 to 1997, with reference to time trends of lung cancer in the world. **Jpn J Cancer Res**, v.93, p.15-23, 2002.
- MOUNTAIN, C. F. New prognostic factors in lung cancer. Biologic prophets of cancer cell aggression. **Chest**, v.108, p.246-54, 1995.
- MOUNTAIN, C. F. Revisions in the international system for staging lung cancer. **Chest**, v.111, p.1710-7, 1997.

- MYONG, N. H. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in human lung carcinomas: its prognostic implication and relationship with wxpressions of p53 and Ki-67 proteins. **J Korean Med Sci**, v.18, p.494-500, 2003.
- NATALE, R. B. Overview of current and future chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer. **Semin Oncol**, v.24(Supl.7), p.S29-S37, 1997.
- NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J Clin Oncol**, v.18, p.1135-49, 2000.
- NSCLCCG. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. **Bmj**, v.311, p.899-909, 1995.
- PAESMANS, M.; SCULIER, J. P.; LIBERT, P.; BUREAU, G.; DABOUIS, G.; THIRIAUX, J.; MICHEL, J.; VAN CUTSEM, O.; SERGYSELS, R.; MOMMEN, P.; KLASTERSKY, J. Response to chemotherapy has predictive value for further survival of patients with advanced non-small cell lung cancer: 10 years experience of the European Lung Cancer Working Party. **Eur J Cancer**, v.33, p.2326-32, 1997.
- PASTORINO, U.; ANDREOLA, S.; TAGLIABUE, E.; PEZZELLA, F.; INCARBONE, M.; SOZZI, G.; BUYSE, M.; MENARD, S.; PIEROTTI, M.; RILKE, F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. **J Clin Oncol**, v.15, p.2858-65, 1997.
- PELOSI, G.; FRAGGETTA, F.; PASINI, F.; MAISONNEUVE, P.; SONZOGNI, A.; IANNUCCI, A.; TERZI, A.; BRESAOLA, E.; VALDUGA, F.; LUPO, C.; VIALE, G. Immunoreactivity for thyroid transcription factor-1 in stage I non-small cell carcinomas of the lung. **Am J Surg Pathol**, v.25, p.363-72, 2001.

- PINTO, C. A.; CARVALHO, P. E.; ANTONANGELO, L.; GARIPPO, A.; DA SILVA, A. G.; SOARES, F.; YOUNES, R.; BEYRUTI, R.; TAKAGAKI, T.; SALDIVA, P.; VOLLMER, R. T.; CAPELOZZI, V. L. Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. **Clin Cancer Res**, v.9, p.3098-104, 2003.
- PUGLISI, F.; BARBONE, F.; DAMANTE, G.; BRUCKBAUER, M.; DI LAURO, V.; BELTRAMI, C. A.; DI LORETO, C. Prognostic value of thyroid transcription factor-1 in primary, resected, non-small cell lung carcinoma. **Mod Pathol**, v.12, p.318-24, 1999.
- REICHENBERGER, F.; EICKELBERG, O.; WYSER, C.; PERRUCHOUD, A. P.; ROTH, M.; TAMM, M. Distinct endobronchial expression of matrix-metalloproteinases (MMP) and their endogenous inhibitors in lung cancer. **Swiss Med Wkly**, v.131, p.273-9, 2001.
- RODENHUIS, S.; SLEBOS, R. J. The ras oncogenes in human lung cancer. **Am Rev Respir Dis**, v.142, p.27-30, 1990.
- ROSELL, R.; MONZO, M.; O'BRATE, A.; TARON, M. Translational oncogenomics: toward rational therapeutic decision-making. **Curr Opin Oncol**, v.14, p.171-9, 2002.
- SAAD, R. S.; LIU, Y. L.; HAN, H.; LANDRENEAU, R. J.; SILVERMAN, J. F. Prognostic significance of thyroid transcription factor-1 expression in both early-stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. **Hum Pathol**, v.35, p.3-7, 2004.
- SATO, H.; TAKINO, T.; OKADA, Y.; CAO, J.; SHINAGAWA, A.; YAMAMOTO, E.; SEIKI, M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. **Nature**, v.370, p.61-5, 1994.

- SHOU, Y.; HIRANO, T.; GONG, Y.; KATO, Y.; YOSHIDA, K.; OHIRA, T.; IKEDA, N.; KONAKA, C.; EBIHARA, Y.; ZHAO, F.; KATO, H. Influence of angiogenetic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v.85, p.1706-12, 2001.
- SIENEL, W.; HELLERS, J.; MORRESI-HAUF, A.; LICHTINGHAGEN, R.; MUTSCHLER, W.; JOCHUM, M.; KLEIN, C.; PASSLICK, B.; PANTEL, K. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. **Int J Cancer**, v.103, p.647-51, 2003.
- SIMI, L.; ANDREANI, M.; DAVINI, F.; JANNI, A.; PAZZAGLI, M.; SERIO, M.; ORLANDO, C. Simultaneous measurement of MMP9 and TIMP1 mRNA in human non small cell lung cancers by multiplex real time RT-PCR. **Lung Cancer**, v.45, p.171-9, 2004.
- SKULADOTTIR, H.; OLSEN, J. H.; HIRSCH, F. R. Incidence of lung cancer in Denmark: historical and actual status. **Lung Cancer**, v.27, p.107-18, 2000.
- SLEBOS, R. J.; KIBBELAAR, R. E.; DALESIO, O.; KOOISTRA, A.; STAM, J.; MEIJER, C. J.; WAGENAAR, S. S.; VANDERSCHUEREN, R. G.; VAN ZANDWIJK, N.; MOOI, W. J.; ET AL. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. **N Engl J Med**, v.323, p.561-5, 1990.
- SPAIN, R. C. The case for mitomycin in non-small cell lung cancer. **Oncology**, v.50(Supl.1), p.35-50, 1993.
- STANLEY, K. E. Prognostic factors for survival in patients with inoperable lung cancer. **J Natl Cancer Inst**, v.65, p.25-32, 1980.

- STENHOUSE, G.; FYFE, N.; KING, G.; CHAPMAN, A.; KERR, K. M. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. **J Clin Pathol**, v.57, p.383-7, 2004.
- STRAUSS, G. M.; KWIATKOWSKI, D. J.; HARPOLE, D. H.; LYNCH, T. J.; SKARIN, A. T.; SUGARBAKER, D. J. Molecular and pathologic markers in stage I non-small-cell carcinoma of the lung. **J Clin Oncol**, v.13, p.1265-79, 1995.
- SWINSON, D. E.; COX, G.; O'BYRNE, K. J. Coexpression of epidermal growth factor receptor with related factors is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v.91, p.1301-7, 2004a.
- SWINSON, D. E.; JONES, J. L.; COX, G.; RICHARDSON, D.; HARRIS, A. L.; O'BYRNE, K. J. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. **Int J Cancer**, v.111, p.43-50, 2004b.
- TAN, D.; LI, Q.; DEEB, G.; RAMNATH, N.; SLOCUM, H. K.; BROOKS, J.; CHENEY, R.; WISEMAN, S.; ANDERSON, T.; LOEWEN, G. Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. **Hum Pathol**, v.34, p.597-604, 2003.
- THOMAS, P.; KHOKHA, R.; SHEPHERD, F. A.; FELD, R.; TSAO, M. S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. **J Pathol**, v.190, p.150-6, 2000.
- THUN, M. J.; LALLY, C. A.; FLANNERY, J. T.; CALLE, E. E.; FLANDERS, W. D.; HEATH, C. W., JR. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. **J Natl Cancer Inst**, v.89, p.1580-6, 1997.

- TOMIDA, S.; KOSHIKAWA, K.; YATABE, Y.; HARANO, T.; OGURA, N.; MITSUDOMI, T.; SOME, M.; YANAGISAWA, K.; TAKAHASHI, T.; OSADA, H. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. **Oncogene**, v.23, p.5360-70, 2004.
- TRAVIS, W. D.; LUBIN, J.; RIES, L.; DEVESA, S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. **Cancer**, v.77, p.2464-70, 1996.
- VACHTENHEIM, J. Occurrence of ras mutations in human lung cancer. Minireview. **Neoplasma**, v.44, p.145-9, 1997.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v.92, p.827-39, 2003.
- WADA, H.; TANAKA, F.; YANAGIHARA, K.; ARIYASU, T.; FUKUSE, T.; YOKOMISE, H.; INUI, K.; MIZUNO, H.; IKE, O.; HITOMI, S. Time trends and survival after operations for primary lung cancer from 1976 through 1990. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.112, p.349-55, 1996.
- WHITSETT, J. A.; WERT, S. E.; TRAPNELL, B. C. Genetic disorders influencing lung formation and function at birth. **Hum Mol Genet**, v.13, p.R207-15, 2004.
- WINDELER, J. Prognosis - what does the clinician associate with this notion? **Stat Med**, v.19, p.425-30, 2000.
- YAMAGUCHI, J. Y.; ARRUDA, M. T.; PEREIRA, J. R.; IKARI, F. K.; NIKAEDO, S. M.; PEREIRA, A. T. A. R. Mudanças na análise comportamental do câncer de pulmão nos últimos 25 anos com relação ao sexo e tipo histológico: experiência do serviço de

oncopneumologia do Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho. **J. Pneumologia**, v.30(Supl.3), p.S122, 2004a.

YAMAGUCHI, N. H.; LICHTENFELS, A. J.; DEMARCHI, L. M.; DA SILVA, A. P.; GARIPPO, A. L.; ALVES, V. F.; MICHELIN, C.; AZEVEDO, P. M.; MOYA, T.; TAKAGAKI, T.; SALDIVA, P. H.; VOLLMER, R. T.; CAPELOZZI, V. L. COX-2, MMP-9, and Noguchi classification provide additional prognostic information about adenocarcinoma of the lung. A study of 117 patients from Brazil. **Am J Clin Pathol**, v.121, p.78-86, 2004b.

YATABE, Y.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. **Am J Surg Pathol**, v.26, p.767-73, 2002.

YOUNES, R. N.; DEUTSCH, F.; BADRA, C.; GROSS, J.; HADDAD, F.; DEHEINZELIN, D. Nonsmall cell lung cancer: evaluation of 737 consecutive patients in a single institution. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v.59, p.119-27, 2004.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer de pulmão. **J. Pneumologia**, v.28, p.41-7, 2002.

ANEXO A – Estadiamento do Câncer de Pulmão

Tumor primário

T_x	Presença de células neoplásicas nas secreções broncopulmonares ou em lavados broncoalveolares, porém tumor não identificado pela radiografia ou broncoscopia.
T₀	Nenhuma evidência de tumor primário.
T_{1s}	Carcinoma <i>in situ</i> .
T₁	Tumor com menos de 3 cm no seu maior diâmetro, circundado por pleura ou tecido pulmonar em toda a sua extensão, sem evidência de invasão proximal a um brônquio lobar ao exame endoscópico.
T₂	Tumor com uma das seguintes características: i) Mais de 3 cm no maior diâmetro; ii) Invade a pleura visceral; iii) Provoca atelectasia ou pneumonite crônica obstrutiva; iv) Estende-se à região hilar, porém, à broncoscopia, o tumor está a pelo menos 2 cm distal à carina principal.
T₃	Tumor de qualquer dimensão, com: i) Invasão direta da parede torácica (incluindo tumores do sulco superior), do diafragma, do pericárdio ou pleura mediastinal, sem invadir estruturas viscerais, grandes vasos ou corpo vertebral; ii) Tumores de qualquer tamanho, a menos de 2 cm da carina principal.
T₄	Tumor de qualquer tamanho invadindo mediastino, comprometendo coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral ou carina, ou a presença de derrame pleural com citologia positiva.

Linfonodos

N_x	Metástases linfonodais não demonstráveis.
N₀	Ausência de metástases linfonodais.
N₁	Metástases linfonodais para a região peribrônquica, linfonodos hilares ipsilaterais ou ambos, incluindo extensão direta (cadeias 10, 11).
N₂	Metástases para linfonodos mediastinais ipsilaterais ou subcarinais (cadeias 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 homolaterais).
N₃	Metástases para linfonodos contralaterais, mediastinais ou hilares ou linfonodos cervicais ou pré-escalênicos, ipsi ou contralaterais.

Metástases

M_x	Metástases à distância não demonstráveis.
M₀	Ausência de metástases à distância.
M₁	Presença de metástases à distância.

Estadiamento final

0	T _{1s} N ₀ M ₀	IIIA	T ₃ N ₁ M ₀ T ₁₋₃ N ₂ M ₀
IA	T ₁ N ₀ M ₀		
IB	T ₂ N ₀ M ₀	IIIB	T ₁₋₃ N ₃ M ₀ T ₄ N ₀₋₃ M ₀
IIA	T ₁ N ₁ M ₀		
IIB	T ₂ N ₁ M ₀ T ₃ N ₀ M ₀	IV	T ₁₋₄ N ₀₋₃ M ₁

ANEXO B - Classificação Histológica do Adenocarcinoma Pulmonar

1. Acinar
 2. Papilar
 3. Carcinoma bronquioloalveolar
 - a. Não-mucinoso (célula clara ou pneumócito tipo II)
 - b. Mucinoso
 - c. Misto – mucinoso e não-mucinoso ou tipo celular intermediário
 4. Sólido com mucina
 5. Misto
 6. Variantes
 - a. Fetal bem diferenciado
 - b. Mucinoso
 - c. Cistoadenocarcinoma mucinoso
 - d. Células em anel de sinete
 - e. Células claras
-

Fonte: BRAMBILLA et al. (2001)

ANEXO C - Capacidade Funcional: Escala de Karnofsky

Capaz para atividades normais e trabalho. Sem necessidade de cuidado especial.	100%	Assintomático. Sem evidência clínica de doença.
	90%	Capaz para atividades normais. Sinais e sintomas discretos de doença
	80%	Capaz para atividades normais, com esforço. Sinais e sintomas de doença
Incapaz para o trabalho. Capaz de cuidar-se em casa.	70%	Independente para auto-cuidado, incapaz para atividades diárias
	60%	Capaz para auto-cuidado, requer auxílio ocasional.
	50%	Requer assistência para auto-cuidado e recursos médicos.
Incapaz para cuidado próprio. Requer assistência equivalente à hospitalar.	40%	Incapacitado, requer cuidado especial e assistência constante.
	30%	Muito debilitado. Indicação de hospitalização, mas sem risco imediato de vida.
	20%	Muito doente. Indicação de tratamento de suporte ativo.
	10%	Moribundo. Progressão rápida da deterioração clínica.
	0	Morto.

Fonte: KARNOFSKY & BURCHENAL (1949)