**Andrea Anneliese Reichmuth Day**

# Nível de expressão tumoral da indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) como marcador biológico e preditor de metástase em pacientes com tumor carcinoide típico broncopulmonar

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

Programa: Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Dr. José Ribas Milanez de Campos

**SÃO PAULO**

**2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Day, Andrea Anneliese Reichmuth
Nível de expressão tumoral da indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) como marcador biológico e preditor de metástase em pacientes com tumor carcinoide típico broncopulmonar / Andrea Anneliese Reichmuth Day. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: José Ribas Milanez de Campos.

Descritores: 1.Tumor carcinoide/classificação 2.Tumores neuroendócrinos/classificação 3.Indolamina-pirrol 2,3,-dioxigenase 4.Tolerância imunológica 5.Linfócitos T/imunologia 6.Metástase

USP/FM/DBD-362/11

Dedido este trabalho à minha avó Paula Day,
meus pais Waldemar e Clarice,
meus irmãos Walter e Ana Christina e
minhas amadas sobrinhas Ingrid e Iohanne
pelo eterno amor incondicional

## AGRADECIMENTOS

`A Deus acima de tudo, pela maravilhosa experiência da vida e por me permitir ser seu instrumento nos cuidados com o próximo.

À todos os pacientes que humildemente apoiaram e colaboraram para a realização deste e vários outros estudos do nosso grupo e por aceitarem ser fonte de conhecimento mesmo durante fases difíceis de dor e sofrimento.

`A memória de minha avó querida, Paula Day, pelo exemplo de força e de amor, sempre com palavras de carinho e determinação.

`A meu amado pai, Waldemar, pelo exemplo de luta e determinação para conquista de nossos objetivos, e por ser absolutamente íntegro e correto. Obrigada por sempre me permitir escolher o meu caminho sempre me apoiando incondicionalmente.

`A minha amada Mãe, Clarice, que apesar de tão pouco estudo, sempre demonstrou imensa sabedoria e bondade diante das situações difíceis, agradeço o constante incentivo para nunca desistir.

Aos meus amados irmãos, Walter e Chris, pelos momentos de descontração, conversas e risadas e pelo incentivo constante para a conclusão desta tese.

Às minhas amadas sobrinhas, Ingrid e Iohanne pelos momentos de alegria e pela eterna demonstração de carinho e amor.

À Lucia Akemi Nukumizu, grande amiga em todos os momentos, bons e ruins, cuja ajuda constante foi indispensável para a realização desta tese.

Aos demais amigos, que entenderam o motivo do afastamento e isolamento para a conclusão desta tese.

Ao Dr. Olavo Ribeiro Rodrigues que pelo exemplo de profissionalismo, academicismo e amor à cirurgia torácica despertou meu interesse pela especialidade e por não ter medido esforços para me apoiar durante a residência e pós-graduação.

Ao Dr. Aurelino Fernandes Schmidt Júnior, pela demonstração de amizade durante minha residência de cirurgia geral, pelo constante incentivo direcionados à cirurgia torácica e pelos ensinamentos nessa área durante a realização de sua tese de doutorado.

Ao amigo Daniel Messias de Moraes Neto, pela convivência durante a residência de cirurgia torácica e pelo incentivo para que integrasse o grupo dos carcinoides permitindo assim a realização deste trabalho, de grande importância em minha vida profissional.

Ao amigo e orientador da tese, Dr. João Carlos das Neves Pereira, por me permitir participar de seu grupo dos tumores carcinoides, e pelo exemplo de paixão pela ciência e pela sua dedicação à cirurgia torácica. Muitas vezes incompreendido pela sua “insanidade genial” mas admirado por todos os que já conviveram com ele pelo seu jeito simples e ao mesmo tempo especial de tratar cada paciente. Obrigada pelos ensinamentos desde a época da residência.

Ao Prof. Dr. José Ribas Milanez de Campos, pelo incentivo constante e pela orientação na fase final da conclusão desta tese. Exemplo de dedicação à cirurgia torácica e sem dúvida um dos cirurgiões que mais contribui para o

crescimento da especialidade no Brasil e o reconhecimento do nosso trabalho em outros países.

À Prof[a] Dra Vera Luiza Capelozzi, que esteve presente desde o início dos trabalhos esclarecendo dúvidas e sugerindo melhorias e por não medir esforços para me ajudar na conclusão desta tese. Exemplo de dedicação à Medicina, com merecido reconhecimento dentro da instituição e também fora do país pelo seu trabalho de excelência na área da patologia.

Ao Dr. Edwin Roger Parras Cuentas, patologista da FMUSP, pelo exemplo de dedicação e pela atenção constante e valiosa ajuda durante todo o processo de análise imunohistoquímica deste trabalho.

Ao Dr. Thomas Kenneth Waddell, do Toronto General Hospital – UHN - Canadá, exemplo de dedicação e amor à profissão e à arte do conhecimento, pelas longas horas de discussão que contribuíram para meu amadurecimento na área de pesquisa e da cirurgia torácica.

Às amigas Sandra de Moraes Fernezlian, Esmeralda Miristene Eher e Ângela Batista dos Santos, profissionais de grande competência do laboratório de Imunohistoquímica da FMUSP, pelo carinho, paciência e grande ajuda no preparo e processamento do material desta tese.

Aos Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene, pelo exemplo de dedicação e excelência na área da cirurgia cardíaca e torácica, pelo constante incentivo e apoio para que esta tese se concretizasse.

Ao Prof. Dr. Noedir Antônio Groppo Stolf pela orientação desta tese no período inicial permitindo assim o prosseguimento com os estudos da mesma.

Ao Prof. Dr. Paulo Manoel Pego Fernandes, pelas sugestões para a melhoria da tese e pelo incentivo para a conclusão da mesma.

Ao Prof. Luiz Felipe Pinheiro, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e Pós-Graduação. Agradeço os comentários e sugestões para a melhoria e conclusão desta tese.

Ao amigo Aristides Tadeu Correia (InCor) e Cecília Aparecida Vaiano Fahart (FMUSP), pela indispensável ajuda na análise estatística desta tese.

Às amigas Rosângela Monteiro, Eliana Ogata e Márcia Cristina Augusto, por sempre estarem dispostas a ajudar e pelo suporte em todos os momentos durante nossos estudos no InCor, na residência e pós-graduação.

À Juliana Lattari Sobrinho, Eva Malheiros de Oliveira e Neusa Rodrigues, pelo apoio, paciência e constante ajuda em todos os aspectos burocráticos da pós-graduação, principalmente na fase de conclusão deste trabalho.

À todos aqueles que apesar de não citados aqui, colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho que tanto contribuiu para meu amadurecimento na área científica.

***“ Na vida, não vale tanto o que temos,***
***nem tanto importa o que somos.***
***Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e,***
***acima de tudo, importa o que fazemos de nós!"***

**Chico Xavier**

Esta tese está de acordo com:

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

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

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

**SUMÁRIO**

**Lista de Siglas**

**Lista de Tabelas**

**Lista de Figuras**

**Resumo**

**Summary**

**1. Introdução .....1**

**2. Revisão de Literatura .....8**

**2.1 Espectro dos Tumores Neuroendócrinos .....9**

2.1.1 – Lesões Pré-neoplásicas.....9

2.1.2 – Lesões Neoplásicas .....9

**2.2 Aspectos Histopatológicos dos Tumores Carcinoides ..... 10**

2.2.1 Etiologia .....10

2.2.2 Aspectos Macroscópicos.....10

2.2.3 Aspectos Microscópicos .....11

2.2.3.1 Microscopia Óptica .....11

2.2.3.2 Microscopia Eletrônica .....11

2.2.3.3 Imunohistoquímica .....12

**2.3 Aspectos Clínicos dos Tumores Carcinoides .....13**

**2.4 Diagnóstico dos Tumores Carcinoides .....14**

2.4.1 Estudos Radiológicos .....14

2.4.2 Estudos Endoscópicos .....14

2.4.3 Estudos Laboratoriais .....15

**2.5 Estadiamento dos Tumores Carcinoides .....15**

**2.6 Tratamento dos Tumores Carcinoides .....15**

2.6.1 Tratamento Curativo .....15

2.6.2 Tratamento Paliativo .....16

2.6.2.1 Cirúrgico .....16

2.6.2.2 Endoscópico .....16

2.6.2.3 Radioterapia e Quimioterapia .....17

**2.7 Tratamento das Metástases e Síndrome Carcinoide .....17**

**2.8 Papel da Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) .....18**
2.8.1 IDO e Neoplasias Pulmonares .....18
2.8.2 Expressão da IDO versus Metástases e Sobrevida.....19
2.8.3 IDO e Potenciais Terapêuticos .....20
**3. Objetivos .....22**
**3.1 Primários .....23**
**3.2 Secundários .....23**
**4. Casuística e Métodos .....24**
**4.1 Casuística e desenho do estudo .....25**
4.1.1 Critérios de Exclusão .....25
**4.2 Métodos .....26**
4.2.1 Coleta de dados .....26
4.2.2 Processamento Histológico e Imunohistoquímico .....26
4.2.2.1 Processamento Histológico .....26
4.2.2.2 Processamento Imunohistoquímico .....27
4.2.3 Análise Imunohistoquímica .....29
4.2.3.1 Determinação da Expressão da IDO .....29
4.2.3.1.1 Análise Semi-Quantitativa da IDO .....29
4.2.3.1.2 Análise Quantitativa da IDO .....30
4.2.3.2 Quantificação de Linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$.....32
4.2.4 Análise Estatística .....33
4.2.4.1 Análise Univariada .....33
4.2.4.2 Análise Multivariada .....34
**5. Resultados .....35**
**5.1 Pacientes .....36**
5.1.1 Idade .....36
5.1.2 Gênero.....36
5.1.3 Localização Tumoral.....36
5.1.4 Tipo de Ressecção Cirúrgica .....36
5.1.5 Estadiamento .....37
5.1.6 Metástase Linfática .. .....38
5.1.7 Metástase Hematogênica .....39

5.1.8 Sobrevida e Óbitos .....39
**5.2 Análise Univariada.....40**
5.2.1 Idade x Metástase .....40
5.2.2.Gênero x Metástase .....41
5.2.3 Localização Tumoral x Metástase.....42
5.2.4 Óbito x Metástase .....42
5.2.5 Intensidade de Expressão da IDO x Metástase .....43
5.2.5.1 Análise Semi-Quantitativa .....43
5.2.5.2 Análise Quantitativa .....47
5.2.6 Infiltração Linfocitária Intratumoral x Metástase.....50
5.2.7 Infiltração Linfocitária Intratumoral x IDO.....52
**5.4 Análise Multivariada por Regressão Logística .....54**
**6. Discussão .....55**
**6.1 Limitações do Estudo .....56**
6.1.1 Desenho do estudo.....56
6.1.2 Coleta de Dados .....56
6.1.3 Dissecção Linfonodal Hilar e Mediastinal.....57
6.1.4 Exames de Imagem.....57
6.1.5 Óbitos durante o seguimento.....58
**6.2 Análise dos Resultados .....58**
6.2.1 Casuística x Metástase .....58
6.2.2 Expressão da IDO x Metástase.....60
6.2.3 Infiltração Linfocitária Intratumoral x Metástase .....62
6.2.4 Correlação entre IDO e Infiltração Linfocitária Intratumoral.....63
6.2.5 Análise Multivariada por Regressão Logística.....64
**7. Conclusões .....65**
**8. Anexos .....67**
**9. Referências Bibliográficas .....72**

## LISTA DE SIGLAS

TCB - Tumores Carcinoides Broncopulmonares

TCTB – Tumores Carcinoides Típicos Broncopulmonares

OMS – Organização Mundial de Saúde

FMUSP - Faculdade de Medicina de São Paulo

IDO – Indoleamine 2,3 dioxigenase

HLA-G - Antígeno Leucocitário Humano classe G

Fas L – Proteína de Fusão de Ligante (pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral)

TGF- beta - Fator Transformador de Crescimento Beta

Gal-1 - Galectina 1

Foxp3+ - F*orkhead box P3*

Treg – Linfócitos T Reguladores

1-MT - 1- Methyl Tryptofano

APUD - Precursores da Captação e Descarboxilação de Aminas

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

TC - Tomografia Computadorizada

PET - *Positron Emission Tomography*

GADOTA-TOC - Análogos da Somastotatina

5-HIAA - Acido 5- Hidroxiindoleacético

ADH - Hormônio Anti-diurético

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

EGFR - Fator de Crescimento Epidérmico

mTOR - Rapamicina de Mamíferos

*NCI - National Cancer Institute*

siRNA - Fragmentos de RNA Interferentes

CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

NEM - Neoplasias Endócrinas Múltiplas

TNM - *Tumor, Node, Metastasis*

HE – Hematoxilina-Eosina

CGA – Campos de Grande Aumento

DAB – 3-3’ Diaminobenzamidina

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

pH – Potencial Hidrogeniônico

PBS – Tampão Fosfato de Sódio

BSA – Soro Albumina Bovina

RGB – *Red, Green, Blue*

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

EP – erro padrão

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 -** Tabela comparativa por grupos e subgrupos do estadiamento TNM 6ª e 7ª edições (Anexo A).....67

**Tabela 2** – Estadiamento global dos casos estudados pela classificação TNM – 7ªedição.....38

**Tabela 3** – Variável idade como fator preditivo de metástase em tumores carcinoides típicos broncopulmonares.....41

**Tabela 4** - Variável gênero como fator preditivo de metástase em tumores carcinoides típicos broncopulmonares.....41

**Tabela 5** - Variável localização tumoral fator preditivo de metástase em tumores carcinoides típicos broncopulmonares.....42

**Tabela 6** – Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes incluídos no estudo (Anexo B) .....68

**Tabela 7 -** Resultados da análise imunohistoquímica dos marcadores IDO e linfócitos T CD4 e CD8 (Anexo C) .....70

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Microscopia eletrônica de tumor carcinoide típico broncopulmonar evidenciando grânulos densos ligados à membrana nuclear.....12

**Figura 2** – Fotografia de lâmina do caso n.60 adquirida com o software Image Pro Plus 5 mostra ajuste e padronização de luminosidade, tempo de exposição e contraste.....31

**Figura 3** – Fotografia de lâmina do caso n.60 mostra a análise digital das imagens com segmentação das cores através de histograma....32

**Figura 4** - Fotografia de lâmina do caso n.60 evidencia a determinação da intensidade de expressão da IDO pela média de absorção de RGB.....32

**Figura 5** - Gráfico dos Procedimentos cirúrgicos empregados no tratamento de TCTB versus freqüência de realização em porcentagem.....37

**Figura 6** - Imunoexpressão da indoleamine 2,3 dioxigenase em TCTB através de estudo imunohistoquímico .....44

**Figura 7** – Gráfico da análise semi-quantitativa da intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos scores de intensidade nos TCTB com e sem metástase.....45

**Figura 8** – Gráfico da análise semi-quantitativa da intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos scores de intensidade nos TCTB com metástase linfática e sem metástase. …….....….46

**Figura 9** – Gráfico da análise semi-quantitativa da intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos scores de intensidade nos TCTB com metástase hematogênica e sem metástase.....47

**Figura 10** – Gráfico da análise quantitativa da intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos valores de absorção RGB nos TCTB com e sem metástase.....48

**Figura 11** – Gráfico da análise quantitativa da intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos valores de absorção RGB nos TCTB com metástase linfática e sem metástase .....49

**Figura 12** – Gráfico da análise quantitativa da intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos valores de absorção RGB nos TCTB com metástase hematogênica e sem metástase.....50

**Figura 13 -** Gráfico da infiltração de linfócitos T $CD8^+$ intratumoral em TCTB com (M+) e sem (M-) metástases representados pela mediana dos valores obtidos em cada grupo.....…….51

**Figura 14 -** Gráfico da infiltração de linfócitos T $CD4^+$ intratumoral em TCTB com (M+) e sem (M-) metástases representados pela mediana dos valores obtidos em cada grupo ….....……52

**Figura 15 -** Gráfico da correlação entre intensidade de expressão da IDO por análise semi-quantitativa versus infiltração de linfócitos T $CD8^+$ intratumoral em TCTB.....53

**Figura 16 -** Gráfico da correlação entre intensidade de expressão da IDO por análise semi-quantitativa versus infiltração de linfócitos T $CD4^+$ intratumoral em TCTB.....54

# RESUMO

Day AAR. Nível de Expressão Tumoral da Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) como Marcador Biológico e Preditor de Metástase em Pacientes com Tumor Carcinoide Típico Broncopulmonar [tese]. Sao Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Os tumores carcinoides típicos broncopulmonares (TCTB) são considerados neoplasias bem diferenciadas e as menos agressivas dentro do espectro dos tumores neuroendócrinos. Entretanto, metástases linfonodais e hematogênicas tem sido encontradas em número considerável de casos e não existem, até o momento, estudos relacionados aos mecanismos de escape imune tumoral em TCTB. Alguns trabalhos tem relacionado a expressão da enzima indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) em células neoplásicas como fator responsável pela aquisição de tolerância tumoral. Além disso, os níveis de infiltração linfocitária intratumoral parecem estar associados com prognóstico e sobrevida nesses tumores. O principal objetivo deste estudo foi determinar os níveis de expressão intratumorais da IDO e sua possível aplicação como marcador biológico de metástases em TCTB. Além disso, também foi estabelecido o padrão de infiltração linfocitária intratumoral e analisada sua provável correlação com os níveis de expressão da IDO. Portanto, realizou-se uma coorte retrospectiva multicêntrica no qual 64 pacientes submetidos à cirurgia de ressecção de TCTB entre 1981 e 2003 foram selecionados. O período de seguimento pós-operatório foi de 5 anos e a ocorrência de metástases linfonodais (hilar ou mediastinal) e hematogênicas foi avaliada através de tomografia computadorizada. Os níveis da expressão da IDO e de infiltração linfocitária intratumoral foram avaliados através de estudo imunohistoquímico. Os resultados obtidos mostraram que dos 64 pacientes selecionados, 17 (26.5%) apresentaram qualquer tipo de metátases durante o estudo: linfonodal, hematogênica ou ambas. A expressão da IDO foi encontrada em

níveis diferentes de intensidade em mais de 80% das células dos TBCT. Entretanto, a análise univariada não mostrou nenhuma diferença significante na expressão da IDO entre grupos com e sem metástase (p=0,9 e p=0,3 pela análise semi-quantitativa e quantitativa, respectivamente). A quantificação dos linfócitos em todos os grupos estudados demonstrou predominância de linfócitos T $CD8^+$, quando comparado aos linfócitos T $CD4^+$($p< 0.01$). Nenhuma diferença na infiltração intratumoral de linfócitos T $CD8^+$ foi encontrada entre grupos com e sem metástase (p=0,98). Entretanto, a quantificação de linfócitos T CD4+ foi nula nos grupos com qualquer tipo de metástase (p=0,01), e nos casos com metástase linfonodal (p=0,02). Nenhuma correlação entre os níveis da expressão da IDO e da infiltração linfocitária intratumoral foi identificada nos grupos analisados (r= -0.2 e p=0,1 para ambos os grupos). Conclui-se que, a expressão intratumoral da IDO não apresenta correlação com a ocorrência de metástase nos TBCT. Apesar de nenhuma diferença ter sido identificada na infiltração intratumoral de linfócitos T $CD8^+$ nos grupos com e sem metástase, a ausência de infiltração de linfócitos T CD4+ está associado à ocorrência do evento estudado. Estes linfócitos parecem conferir um efeito protetor evitando o escape tumoral.

Descritores: 1.Tumor carcinoide/classificação 2.Tumores neuroendócrinos/classificação 3.Indolamina-pirrol 2,3,-dioxigenase 4.Tolerância imunológica 5.Linfócitos T/ imunologia 6.Metástase

**SUMMARY**

Day AAR. Tumor Expression Level of Indoleamine 2,3 dioxygenase as Biological Marker and Metastasis Predictor in Patients with Typical Bronchopulmonary Carcinoid Tumors [tesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo; 2011.

Typical bronchopulmonary carcinoid tumors (TBCT) are considered the less aggressive neoplasm within the spectrum of neuroendocrine tumors. However, regional nodes and haematogenic metastasis occur in a considerable rate and no data regarding immune escape mechanisms in these tumors are available. Some studies have implicated indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression in malignant cells as the responsible for tumor tolerance. Also, levels of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) seem to be related with prognosis and survival. Our aim in this study was to determine intratumoral IDO expression levels and the value of this variable as a predictive marker of TBCT metastasis. Thus, TILs pattern was determined and correlation with intratumoral IDO expression analyzed. For this purpose, a multicenter *retrospective* cohort study was performed and 64 patients operated on for TBCT between 1981 and 2003 were enrolled. Follow-up period was 5 years and regional or haematogenic metastasis was assessed by computerized tomography (CT) scan. Levels of IDO expression and TILs were assessed by immunohistochemical study. The results obtained showed that of all 64 patients, 17 (26,5%) presented with any metastasis during the study: regional nodes, haematogenic or both. IDO expression was found in different intensity levels in over 80% of TBCT cells. However, univariate analysis showed no significant difference in IDO expression between groups with and without metastasis (p=0,9 and p=0,3 for semi-quantitative and quantitative analysis respectively). TILs quantification in all studied groups demonstrated predominance of $CD8^+$ TILs when compared to $CD4^+$ TILs

($p<0,01$). No difference in $CD8^+$ TILs was found between groups with and without metastasis ($p=0,98$). However $CD4^+$ TILs quantification was null in the groups with any metastasis ($p=0,01$), and regional nodes metastasis ($p=0,02$). No correlation between IDO expression levels and TILs was identified in all analyzed groups($r= -0,2$ and $p=0,1$ for both groups). In conclusion, these data shows that intratumoral IDO expression do not correlate with TBCT metastasis. Even though no difference in $CD8^+$ TILs between groups with and without metastasis was found, absence of $CD4^+$ TILs is associated with the studied event. These cells seem to confer a protective effect against tumoral immune escape.

Keywords: 1. Carcinoid tumor/classification 2.Neuroendocrine tumors/classification 3. Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase 4. Immunology tolerance 5. Lymphocytes T/ immunology 6. Metastasis.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

Tumores carcinoides são neoplasias neuroendócrinas bem diferenciadas com a capacidade de produzir neuropeptídeos. Acometem frequentemente o trato gastrointestinal porém são encontrados no trato respiratório em cerca de 25 a 30% dos casos. Dentre as neoplasias pulmonares, os tumores carcinoides são pouco freqüentes, correspondendo a 1 a 2% dos casos. Entretanto, segundo a literatura, a incidência desses tumores vem aumentando nos últimos anos, com cerca de 4400 novos casos por ano nos Estados Unidos, o que pode ser justificado em parte pelo avanço nos métodos diagnósticos [1-3].

Os tumores carcinoides broncopulmonares (TCB) foram mencionados pela primeira vez em 1831, por Laennec[4], que os descreveu como massas endobrônquicas. Outros relatos semelhantes foram encontrados nesta mesma época[5] porém o termo **"carcinoide"** que significa **"semelhante à carcinoma"** foi introduzido apenas em 1907 pelo médico alemão Oberndorfer[1,2].

A primeira descrição de tratamento dos TCB foi feita em 1914 por Chevalier Jackson que realizou a ressecção endobrônquica de um tumor caracterizado como adenoma brônquico[5]. Outras propostas de tratamento surgiram nas décadas de quarenta e cinqüenta. Em 1939, Eloesser descreveu a broncotomia para o tratamento dos TCB mas o pioneiro nos procedimentos de ressecção segmentar e ressecção "em manga" foi Price Thomas em 1946[6]. O termo adenoma brônquico, para denominação dos TCB, foi inicialmente proposto em 1930, entretanto, apesar de caracterizados como tumores benignos, pesquisadores da época já reconheciam que os TCB apresentavam sinais de malignidade. Este fato promoveu várias discussões a respeito da embriologia tumoral e potencial metastático dos TCB[1,2,5,6].

Em 1972 Arrigoni et al[7] descreveram um subtipo de TCB com histologia atípica e comportamento mais agressivo sendo denominado carcinoide

atípico. Este subtipo de tumor carcinoide apresentava até 70% de metástases nos casos relatados. Desde então os tumores neuroendócrinos passaram a ser compreendidos como um espectro de neoplasias de baixo a alto grau de malignidade, sendo classificados em tumores carcinoides típicos, atípicos e tumores neuroendócrinos de pequenas células.

Em 1985, foi proposto outro sistema de classificação dos tumores neuroendócrinos denominado carcinomas de células de Kulchitsky: I - tumores carcinoides típicos, II - tumores carcinoides atípicos e III - tumores neuroendócrinos de pequenas células, classificação essa que não foi aceita como padrão pelos pesquisadores da época[1].

Apesar da inconsistência da literatura sobre a terminologia empregada aos tumores neuroendócrinos e seguindo a mesma linha de raciocínio de Arrigoni, em 1991[8] o patologista William Travis propôs, após análise detalhada de 35 casos de tumores neuroendócrinos, a inclusão do grupo carcinoma de grandes células aos tumores neuroendócrinos, que seria um subtipo intermediário entre os tumores carcinoides atípicos e os neuroendócrinos de pequenas células. Esta classificação foi aceita desde então até 1999 quando foram estabelecidos os critérios histológicos, reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), para a classificação dos tumores neuroendócrinos[9,10]. Esta classificação foi revisada em 2004 sendo utilizada pelos centros especializados no assunto desde então. De acordo com essa classificação, os tumores carcinoides típicos broncopulmonares (TCTB) são neoplasias de baixo grau de malignidade que apresentam à microscopia óptica, limitado número de figuras de mitose e ausência de necrose em campos de grande aumento[11].

Embora seja contraditória a idéia de metástases em tumores com baixo grau de malignidade, vários trabalhos tem mostrado que os TCTB podem apresentar metástase linfática ou hematogênica em número relevante de casos[12-19]. Segundo Thomaz et al[18], a presença de metástases linfonodais e hematogênicas pode ocorrer em até 19% e 3% dos casos, respectivamente. A experiência com o estudo e acompanhamento de cerca de 330 pacientes do Serviço de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina de São Paulo

(FMUSP) e do Hospital George Pompidou de Paris, assim como estudos retrospectivos de 126 pacientes operados nos Hospitais das Universidades de Coimbra e Lisboa, mostraram resultados semelhantes com incidência de metástases linfáticas e hematogênicas de 15% e 5%, respectivamente[12,13]. Além disso, os trabalhos mencionados também evidenciam a importância da ocorrência de metástases no que se refere à sobrevida global dos pacientes com TCTB. Mesmo aqueles pacientes portadores de TBCT com comprometimento metastático de linfonodos de primeira ordem já apresentam diminuição de cerca de 10% na sobrevida global, apesar do excelente prognóstico desses tumores com sobrevida de 90% e 80% em 5 e 10 anos, respectivamente.

Infelizmente, os métodos investigativos disponíveis atualmente somente evidenciam metástases quando as mesmas já estão presentes. Apesar dos avanços no conhecimento sobre esse assunto alcançado nos últimos anos e esforços de pesquisadores dessa área, ainda não se tem um método eficaz de detecção precoce de metástases ou marcadores preditivos amplamente aceitos pelos grupos e instituições especializadas no assunto. Diversos grupos tem usado de rotina técnicas diagnósticas complementares como microscopia eletrônica, citometria de fluxo e mais comumente a imunohistoquímica para identificação de marcadores de proliferação celular, angiogênese e apoptose entre outros, na tentativa de melhor compreensão da biologia tumoral e identificação de potenciais marcadores de pior prognóstico e riscos de metástases[1,2,20-25]. Porém, para que se prossiga com o aprimoramento dos métodos de detecção e predição de metástases é necessário ainda compreender como e porque ocorrem as metástases. Além disso, estudos realizados por Neto et al[14], mostraram que os TCTB podem apresentar micrometástases para o sistema linfático sem que necessariamente ocorram macrometástases e conseqüente evolução da doença.

Diversos estudos sobre a complexa biologia tumoral tem sido desenvolvidos na tentativa de se compreender como o sistema imunológico reconhece as células tumorais e promove a eliminação das mesmas ou a

razão pela qual em alguns casos as células tumorais conseguem driblar o sistema imunológico do hospedeiro e proliferar[26-29]. Na década de setenta, Burnet et al[26] propôs o termo imunovigilância, cuja definição seria a capacidade do sistema imune de proteger o organismo de qualquer crescimento tumoral através do reconhecimento e consequente eliminação de células anormais ou malignas. Esta hipótese foi bastante criticada por vários anos mas alguns trabalhos já na década de oitenta mostraram que esta teoria seria aplicável ao menos em tumores induzidos por infecções virais[30]. Na década de noventa, trabalhos publicados por Dighe et al[31] e Van den Broek et al[32] mostraram que a manipulação de mecanismos efetores do sistema imune, como por exemplo, o interferon-gama, regulam o desenvolvimento tumoral e rejeição nos transplantes.

Complementar ao conceito inicial de imunovigilância, Dunn et al[27], em 2002, propôs um conceito mais complexo de modulação do sistema imunológico do hospedeiro. Inicialmente o sistema imune tende a eliminar todas as células tumorais ou reconhecidas como não-próprias do hospedeiro, porém algumas células com variação fenotípica não são eliminadas e proliferam, caracterizando uma fase de equilíbrio entre hospedeiro-tumor. As células tumorais que proliferam e permitem que o tumor escape da imunovigilância do hospedeiro criam um estado anormal de tolerância do hospedeiro contra seus próprios antígenos.

Vários mecanismos tem sido implicados no processo de escape e imunomodulação tumoral: a supressão de proteínas apresentadoras de antígenos como o antígeno leucocitário humano - HLA/classe 1; o aumento de proteínas imunossupressoras como as proteínas de superfície celular Fas Ligante e HLA-G; proteínas inibitórias da família B7; citocinas como o fator transformador de crescimento (TGF-beta) e Galectina (Gal-1); enzimas como a Indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO) e também a indução e expansão de células imunossupressoras como linfócitos Foxp3+ Treg. Acredita-se que estes mecanismos ocorram concomitantemente e não individualmente no microambiente tumoral[28,33,34].

Na última década a IDO tem sido foco de investigação freqüente pelo seu potencial efeito imunomodulador e terapêutico. As pesquisas iniciais a respeito da imunorregulação mediada pela IDO foram realizados por Munn e Mellor[35] em 1998, que conseguiram comprovar seu papel no fenômeno de tolerância à aloenxertos utilizando um modelo experimental com camundongos onde fêmeas prenhas perderam seus fetos quando receberam o inibidor competitivo da IDO, 1-methyl tryptofano (1-MT). O bloqueio da enzima ao nível dos sinciciotrofoblastos na interface materno-fetal permitiu aos linfócitos maternos a rejeição do feto. Este fato despertou o interesse de pesquisadores do mundo todo iniciando inúmeros trabalhos tanto na área de neoplasias, como também dos transplantes e doenças infecciosas[36-38].

A IDO é uma enzima intracelular citoplasmática que está envolvida no processo de catabolismo do triptofano, um aminoácido essencial para manutenção do ciclo celular de inúmeras células, através da via da quinurenina. É expressa em células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, macrófagos e monócitos de diversos tecidos como cólon, endométrio, pulmões e tecido gastrointestinal,sendo que o estímulo para sua expressão se dá principalmente após o estímulo inflamatório com liberação da citocinas como interferon-gama. A IDO também é encontrado em células da interface materno-fetal e interessantemente em células tumorais. O processo de imunorregulação pela IDO que favorece o escape imune e crescimento tumoral parece ocorrer através de dois principais mecanismos. O primeiro seria através da depleção do triptofano no microambiente tumoral. Este aminoácido é essencial para a proliferação de algumas células do sistema imune como por exemplo, os linfócitos, que são sensíveis aos níveis tissulares do triptofano. Experimentos in vitro mostraram que baixos níveis de triptofano bloqueiam a proliferação de linfócitos na fase G1 do ciclo celular impossibilitando sua expansão clonal. Desta forma as células que não conseguem proliferar acabam sofrendo apoptose. O segundo mecanismo responsável pela imunorregulação pela IDO seria o acúmulo de metabólitos tóxicos derivados da degradação do triptofano. A clivagem de

triptofano promove acúmulo de metabólitos como o ácido 3-hidroxiantranílico, quinurenato e quinolinato que em altas doses (>100µM) causam inibição da proliferação de linfócitos e também podem levar à apoptose ou morte celular[38].

Muito embora os dados apresentados representem um extenso trabalho no sentido de compreensão da biologia tumoral e processo de imunomodulação, não existe até o momento, que seja de nosso conhecimento, estudo a respeito do processo de escape tumoral nos TCTB, além de haver poucos marcadores indicativos de pior prognóstico e menor sobrevida. Nosso objetivo com este trabalho, portanto, foi determinar se a enzima IDO pode ser considerada preditiva de risco de metástase linfática ou hematogênica em TCTB além de investigar provável correlação entre infiltração linfocitária intratumoral e a ocorrência de metástase.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Espectro dos Tumores Neuroendócrinos

#### 2.1.1 Lesões pré-neoplásicas

São condições raras caracterizadas pela proliferação de células neuroendócrinas isoladas ou agrupadas, então denominadas de corpos neuroepiteliais. Quando essas proliferações se estendem além da membrana basal são identificadas como tumorlets que por definição são menores que 5 mm. Essas proliferações são observadas em pessoas que vivem em altas atitutes e pacientes portadores de injúria pulmonar tais como bronquiolite obliterante, doença pulmonar intersticial e portadores de tosse crônica, sendo considerado como resposta adaptativa e reativa às condições existentes[20].

#### 2.1.2 Lesões Neoplásicas

De acordo com a mais recente revisão da OMS de 2004 os tumores neuroendócrinos são classificados em neoplasias de baixo, intermediário e alto grau de malignidade. Os TCTB são considerados de baixo grau de malignidade com sobrevida maior que 80% em 5 anos. Os carcinoides atípicos são considerados de intermediário grau de malignidade sendo que apresentam até 70% de ocorrência de metástases e sobrevida em torno de 50% em 5 anos. Já os tumores de grandes células, os de pequenas células e os mistos: grande-pequenas células são denominados de alto grau de malignade, de comportamento bastante agressivo e prognóstico sombrio, tendo sobrevida em 5 anos de menos de 20%[9,10,20].

## 2.2 Aspectos Histopatológicos dos Tumores Carcinoides

### 2.2.1 Etiologia

Embora ainda não haja um consenso na literatura a respeito da origem dos tumores carcinoides, muitos autores acreditavam que os mesmos pudessem ser originados de células dos sistema APUD ( precursores da captação e descarboxilação de aminas) derivados da crista neural, entretanto, atualmente se acredita que a origem desses tumores provém de células tronco do epitélio brônquico derivados do endoderma conhecidos como células de Kulchitsky. Ao contrário dos carcinomas de pulmão, no caso dos TCB não se identificou nenhum agente externo ambiental, toxina ou qualquer outro fator causal relacionado ao desenvolvimento desses tumores[1,2].

### 2.2.2 Aspectos Macroscópicos

A maioria dos TCB se encontra nas vias aéreas centrais: cerca de 20% nos brônquios principais, aproximadamente 60% nos brônquios lobares e segmentares e os demais 20% são localizados perifericamente. Embora a porcentagem de lesões nos lobos pulmonares seja semelhante, o maior número de lobos à direita estabelece uma certa predominância de lesões neste hemitórax em comparação com o hemitórax esquerdo (59% versus 41%)[20].

Os TCB são tipicamente lesões sésseis, embora alguns poucos possam ser polipóides, tem coloração róseo-púrpura, são altamente vascularizados e recobertos por epitélio intacto. Áreas extensas de ulceração são raras. São chamados de tumores iceberg pois geralmente a maior parte do tumor se encontra no espaço extraluminal[1,2].

### 2.2.3 Aspectos Microscópicos

#### 2.2.3.1 Microscopia Óptica

Histologicamente, todos os TCTB são proliferações bem diferenciadas, consideradas como tendo baixo grau de malignidade, apresentam duas ou menos figuras de mitose em 10 campos microscópicos de grande aumento, com ausência de áreas de necrose. Além desses critérios, também deve ter um tamanho superior a 5 mm, determinado arbitrariamente para os diferenciar dos “tumorlets”. Os TCTB, em geral, são diagnosticados quando possuem diâmetro menor que três centímetros. Podem apresentar padrão histológico variando de tecido adenóide a tecido paraganglionar sólido ou trabecular.

Os tumores carcinoides atípicos são também considerados bem diferenciados mas com intermediário grau de malignidade, exibindo taxa de mitose entre 2 a 10 divisões por dez campos microscópicos de grande aumento ou com áreas focais de necrose[1,2,11,20].

#### 2.2.3.2 Microscopia Eletrônica

Segundo Capelozzi et al[21], a microscopia eletrônica pode ser bastante útil na diferenciação de TCTB e carcinomas neuroendócrinos de pequenas células. Embora ambos mostrem condensação da heterocromatina na periferia do núcleo, próxima à membrana nuclear, os TCTB apresentam grânulos caracteristicamente abundantes, densos e ligados à membrana, com heterogeneidade considerável em tamanho e configuração (Figura 1). Essa diferença evidente e significante não é observada quando se analisa os tumores carcinoides atípicos e os carcinomas neuroendócrinos de grandes células. A sobreposição de características nucleares, citoplasmáticas e granulares nesses tumores quando estudados pela microscopia eletrônica impede tal diferenciação sendo portanto as características nucleares e

mitoses vistas na microscopia óptica ainda os critérios mais importantes para distinguir entre os quatro tipos de tumores neuroendócrinos.

**Figura 1 – Microscopia eletrônica de tumor carcinoide típico broncopulmonar evidenciando grânulos densos ligados à membrana nuclear. Aumento 6000x. J Bras Pneumol 34(10):804-11,2008. Com permissão.**

### 2.2.3.3 Imunohistoquímica

O diagnóstico histopatológico de tumores carcinoides pode ser difícil pois podem eventualmente ser confundidos com tumores neuroendócrinos de pequenas células. Além disso, os tumores de pequenas células podem ocorrer concomitantemente a outros tipos tumorais como tumores neuroendócrinos de grandes células e outros não pequenas células. Associado ao aspecto histopatológico, marcadores celulares e de junção e adesão intercelular, como fascina, CD99 e E-caderina, podem ser bastante úteis no processo de diferenciação tumoral. O marcador de proliferação celular, Ki-67, tem sido considerado bastante útil na diferenciação dos tumores neuroendócrinos e tem sido amplamente utilizado na prática clínica. Outros marcadores de peptídeos e aminas incluindo cromogranina A,

enolase neurônio específica, serotonina, sinaptofisina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) também podem ser úteis no diagnóstico diferencial dos tumores neuroendócrinos[20,22-24].

Além do processo de diferenciação tumoral, vários estudos com marcadores tumorais tem tentado estabelecer uma correlação entre os níveis de expressão e incidência de metástases. Das Neves Pereira e Capelozzi, em 2004, evidenciaram, em estudo com 55 pacientes com TCTB, correlação dos níveis de Blc2 e densidade de matriz extracelular com metástase linfática. Em 2008, os mesmos autores publicaram uma análise multicêntrica com 330 pacientes com TCTB demonstrando, em análise univariada, correlação na expressão de p53, Ki-67, Blc2 e neoangiogênese com a ocorrência de metástase linfática, entretanto na análise multivariada, a variável identificada como preditiva de metástase foi a neoangiogênese, quantificada pela densidade de microvasos[12-14].

## 2.3 Aspectos Clínicos dos Tumores Carcinoides

A maioria dos pacientes portadores de TCTB são sintomáticos ao diagnóstico, sendo os sintomas mais freqüentes os relacionados com obstrução brônquica como tosse persistente, hemoptise e pneumonia recorrente. Menos frequentemente observam-se sintomas como broncoespasmo, dor torácica e dispnéia.

As síndromes endócrinas, como secreção ectópica de insulina, e neuroendócrinas como síndrome carcinoide (secreção tumoral de serotonina), síndrome de cushing (secreção tumoral de ACTH) e outras são observadas em menos de 10% dos casos mas podem ser a primeira manifestação clínica desses pacientes. A síndrome carcinoide é a mais comumente observada porém geralmente está associada a tumores com metástases hepáticas[39,40].

## 2.4 Diagnóstico dos Tumores Carcinoides

### 2.4.1 Estudos Radiológicos

Os métodos radiológicos utilizados na prática clínica são a radiografia e tomografia computadorizada (TC) de tórax que evidenciam anormalidades em mais de 75% dos casos através da presença direta ou indireta de obstrução brônquica pela massa tumoral. Outros métodos complementares, mas não indispensáveis são o PET (*Positron Emission Tomography*)- scan, PET associado a análogos da somastotatina (GADOTA-TOC), radiomarcadores como C-5- hidroxitriptofano associado a TC e a Imunocintilografia de receptores de somatostatina. Embora amplamente citados na literatura e com porcentagem de acuraria bastante relevantes, todos tem limitações além de não serem amplamente disponíveis nos serviços de referência no Brasil. A Ressonância Magnética, de modo geral, não acrescenta maiores informações diagnósticas quando comparada com a TC de tórax[20,39-41].

### 2.4.2 Estudos Endoscópicos

Associado ao estudo radiológico a broncoscopia flexível é o método mais utilizado para avaliação diagnóstica de massas endobrônquicas. Apesar de relatos de sangramento endobrônquico pós-biópsia tumoral ou tentativa de excisão completa ou parcial da lesão, muitos advogam que fragmentos podem ser obtidos com segurança instilando-se solução de adrenalina no sítio da biópsia ou utilizando-se associação de anestesia geral e broncoscopia rígida. A biópsia transbrônquica por agulha fina e biópsia transtorácica são métodos complementares que podem ser utilizados na investigação diagnóstica dos tumores carcinoides centrais e periféricos, respectivamente. Entretanto, ambos os métodos apresentam uma questão de absoluta importância. A amostra tumoral nesses casos pode não ser suficiente para um diagnóstico diferencial eficaz dos tumores

neuroendócrinos. Muitas vezes os TCTB e atípicos podem ser confundidos com o carcinoma de pequenas células, pois esses tumores apresentam várias características em comum. Portanto é bastante difícil definir conduta terapêutica baseado apenas nestes métodos diagnósticos[42-44].

### 2.4.3 Estudos Laboratoriais

São pouco úteis quando se trata do diagnóstico da massa endobrônquica ou periférica pulmonar em si, porém podem ser úteis na suspeita de síndromes neuroendócrinas, como a pesquisa do ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) para diagnóstico de síndrome carcinoide, dosagem de níveis séricos de ACTH, ADH (hormônio anti-diurético) e outros hormônios e peptídeos, associado a pesquisa de focos ectópicos de produção hormonal[25].

## 2.5 Estadiamento dos Tumores Carcinoides

Os tumores carcinoides são estadiados da mesma forma que as demais neoplasias pulmonares, sendo que mais de 50% dos TCTB apresentam-se no estádio I. Por outro lado os tumores carcinoides atípicos em mais de 50% dos casos são diagnosticados no estádio II ou III, com envolvimento linfonodal associado[2,39].

## 2.6 Tratamento dos Tumores Carcinoides

### 2.6.1 Tratamento Curativo

O tratamento de escolha para a maioria dos TCB é a ressecção cirúrgica completa. Embora seja advogado por alguns autores, a ressecção econômica, como segmentectomia e a ressecção em cunha para os tumores periféricos, não é considerada a melhor opção terapêutica pelo potencial

metastático dessas lesões e pela necessidade de apropriada linfadenectomia dos linfonodos de primeira ordem para adequado estadiamento e tratamento. Portanto, a lobectomia é considerada a mínima ressecção aceitável. Nos tumores centrais acometendo brônquio fonte direito ou esquerdo, quando não existe dano pulmonar distal irreversível e pode-se obter margens histológicas negativas, a lobectomia com ressecção "em manga" é considerada uma abordagem cirúrgica de escolha, na tentativa de preservação de parênquima pulmonar[1,2,45].

A mediastinoscopia pré-operatória, realizada em alguns serviços de cirurgia torácica de rotina para adequado estadiamento da doença, não acrescenta quaisquer vantagens quando se trata de tumores carcinoides já que a linfadenectomia é mandatória nesses casos[1,15,20,39].

### 2.6.2 Tratamento Paliativo

#### 2.6.2.1 Cirúrgico

A broncotomia com ressecção tumoral não associada à ressecção pulmonar tem sido descrita na literatura como método paliativo para tratamento dos TCB em pacientes selecionados, porém o seguimento pós-operatório deve ser mantido indefinidamente já que a recidiva tumoral pode ocorrer tardiamente[46].

#### 2.6.2.2 Endoscópico

Vários grupos tem proposto o tratamento broncoscópico como alternativa única ou em associação ao tratamento cirúrgico para os TCB. Na maioria dos casos prefere-se a broncoscopia rígida para manejo seguro e mais adequado da via aérea. Os métodos mais utilizados tem sido a ressecção mecânica associado a ablação por Nd:YAG-laser ou eletrocautério. A terapia fotodinâmica e crioterapia também tem sido

descritas com bons resultados. A avaliação pós-ressecção é geralmente feita com TC de alta resolução e ultrassonografia endobrônquica para avaliação de lesão residual extraluminal. Segundo a literatura, este tipo de abordagem terapêutica não causa impacto na sobrevida dos pacientes e além disso possibilita o tratamento definitivo de até 50% das lesões endobrônquicas[20,47,48].

Em geral, o tratamento endoscópico é realizado na maioria dos serviços de cirurgia torácica apenas como ponte para o tratamento cirúrgico, como intuito de desobstruir as vias aéreas, ou em casos selecionados que não podem ser submetidos à ressecção cirúrgica curativa[47].

#### 2.6.2.3 – Radioterapia e Quimioterapia

Os TCB são geralmente resistentes à radioterapia e este tipo de modalidade é utilizado como terapia adjuvante somente nos casos em que a ressecção cirúrgica não é factível ou nos pacientes com ressecção cirúrgica incompleta. Assim como a radioterapia, a quimioterapia para tratamento de TCB não possui nenhum valor comprovado. Até o momento, não existe evidência de que a quimioterapia tradicional ou associação de quimio-radioterapia prolongue a sobrevida e/ou melhore a qualidade de vida de pacientes portadores desses tumores[1,2,39].

### 2.7 Tratamento das Metástases e Síndrome Carcinoide

A ocorrência de síndrome carcinoide associado aos TCB está relacionada ao tamanho tumoral e principalmente à ocorrência de metástases, sendo o fígado o órgão mais frequentemente acometido. Assim como para a lesão primária, todas as metástases identificadas devem ser submetidas à ressecção cirúrgica quando possível a fim de se obter um melhor controle dos focos ectópicos de produção de peptídeos e neurotransmissores causadores da síndrome. Outras opções terapêuticas que são empregadas principalmente para tratamento das lesões hepáticas

com resultados satisfatórios são a termoablação por radiofreqüência, injeção de etanol ou ácido acético intratumoral, quimioembolização ou radioembolização[49].

O tratamento padrão para as lesões irressecáveis assim com a síndrome carcinoide geralmente é feito através da injeção de octreotide ou outros análogos da somatostatina como lanreotide e mais recentemente tem sido utilizado o pasireotide, que possui maior afinidade aos receptores da somatatostatina. Outra alternativa terapêutica que parece bastante promissora consiste no tratamento com radionuclídeos para receptores de somatostatina, porém nenhum estudo randomizado com esta modalidade de tratamento foi possível até o momento.O tratamento dos tumores carcinoides avançados com interferon-α, como droga inibidora da proliferação tumoral, mostrou estabilização da doença em cerca de 35% dos pacientes[2 e 20].

As mais recentes pesquisas nesta área tem mostrado que o fato desses tumores serem altamente vascularizados pode indicar potenciais agentes terapêuticos como bloqueadores de receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bloqueadores do fator de crescimento epidérmico(EGFR), bloqueadores de moduladores do ciclo celular como os bloqueadores da rapamicina de mamíferos (mTOR) e novos agentes citotóxicos como bevacizumab e everolimus associados a análogos da somatostatina. Diversos estudos fase II e fase III estão em andamento utilizando esses agentes terapêuticos porém ainda sem dados publicados [2,50,51].

## 2.8 Papel da Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO)

### 2.8.1 - IDO e Neoplasias Pulmonares

São poucos os estudos publicados sobre a IDO em tumores pulmonares e os artigos disponíveis apresentam resultados às vezes divergentes quanto ao papel dessa enzima na imunorregulação tumoral[52-55]. Segundo Astigiano et al[53], as células inflamatórias que infiltram o tecido

tumoral, como os granulócitos eosinofílicos, é que verdadeiramente expressam a IDO e não as células tumorais. Seria então através destas células inflamatórias que a IDO exerceria seu efeito imunossupressor.

Um dos trabalhos com maior casuística, realizado na Universidade de Hamamatsu no Japão pelo grupo de Suzuki et al[54], com 123 pacientes com neoplasia pulmonar e 45 pacientes saudáveis mostrou que as concentrações séricas de triptofano eram significativamente menores em pacientes com neoplasia quando comparadas aos controles. Além disso, a dosagem de atividade da IDO através da razão valor sérico de quinurenina/triptofano mostrou valores maiores de IDO nos pacientes com neoplasia havendo também correlação do aumento desta enzima com estádios mais avançados.

Embora muitos dos trabalhos referenciados[52-55] apresentem casuística questionável, a maioria mostrou resultados semelhantes a outros estudos com tumores extra pulmonares associando o nível de expressão da IDO com ocorrência de metástase e piora na sobrevida[56-60].

### 2.8.2 – Expressão da IDO versus Metástases e Sobrevida

Brandacher G[56] et al, mostraram que níveis de IDO nas amostras teciduais de 143 pacientes com tumores colorretais tiveram direta correlação com o grau de infiltração de linfócitos T $CD3^+$ e a ocorrência de metástases hepáticas. Naqueles pacientes com altos níveis de expressão de IDO, o grau de infiltração de linfócitos T $CD3^+$ foi significativamente menor e a incidência de metástases significativamente maior. Ino K[57] et al, também mostraram resultados semelhantes com um estudo em amostras de 65 pacientes com câncer endometrial onde altos níveis de IDO se correlacionaram com menor infiltração de linfócitos $CD3^+$ e $CD8^+$ e menor sobrevida. Outros estudos em amostras de pacientes com carcinoma de células renais, hepatocarcinoma e outros órgãos tem mostrado resultados semelhantes[58-60].

Alguns autores como Gao et al[61], mostraram que o padrão de expressão da IDO no carcinoma de cólon pode ser paradoxo. A IDO é expressa não somente no tecido tumoral mas nos linfonodos peritumorais. Segundo Gao, altos níveis de IDO nos linfonodos peritumorais foram observados nos casos sem metástases e baixos níveis da enzima nos pacientes com metástases. A observação de que a IDO apresenta diferença de expressão em tecidos diferentes pode também significar diferença funcional nesses tecidos.

Apesar da diversidade dos métodos e casuística, os trabalhos publicados até aqui mostram que a IDO pode ser considerada, entre outras variáveis, como preditiva de metástases nos pacientes com neoplasias.

### 2.8.3 – IDO e Potenciais Terapêuticos

Imunoterapia como tratamento padrão ou complementar à quimioterapia em pacientes com diferentes tipos de neoplasia tem sido cada vez mais utilizada fazendo parte de inúmeros estudos clínicos fase I a III. A utilização de anticorpos monoclonais, como anti-CTLA4, vacinas anti-vírus oncogênicos e citocinas como interferon-gama estimulam o sistema imune do paciente através da expansão de linfócitos T tumor-reativos, promovem estímulo exógeno potencializando a ativação do sistema imune além de antagonizar vias inibitórias que favorecem o processo de tolerância tumoral. A associação desses efeitos potencializa o ataque dos agentes quimioterápicos às células neoplásicas[62,63].

Imunomodularores como 1- Metil Triptofano (1-MT) tem sido amplamente utilizados em estudos experimentais e clínicos (fase 1). Este inibidor competitivo da IDO tem inúmeras vantagens quando comparado aos demais agentes imunoterápicos como custo acessível, facilidade de administração (oral) e facilidade de rastreamento da droga no organismo através da dosagem de níveis séricos de seus metabólitos. Nos estudos pré-clínicos o resultado da inibição da atividade da IDO (mais especificamente IDO1) promove a ativação do sistema imune resultando em menor

progressão tumoral e maior sobrevida. Com relação aos estudos clínicos, existe um estudo multicêntrico (NCT00567931) em fase I em andamento nos Estados Unidos, iniciado em 2007 e supervisionado pelo Instituto Nacional de Câncer (*National Cancer Institute)* com o intuito de avaliar o efeito do 1-Metil-D-Triptofano em pacientes com tumores sólidos irressecáveis portadores de metástases ou recidivantes. Infelizmente ainda não se tem nenhum dado sobre os resultados deste estudo. A avaliação da segurança do uso desse imunomodulador permitirá avançar nos estudos sobre eficácia e comparação terapêutica com outras drogas e imunomodulares[64,65].

A terapia genética também tem sido objeto de grande interesse da comunidade científica nos últimos anos com uma aplicação direta na terapia contra o câncer. Atualmente consegue-se, através da administração de nanopartículas associados a fragmentos de RNA interferentes (siRNA), silenciar ou "desligar" um gene responsável ou envolvido no processo de proliferação tumoral ou de escape imune[66]. Partindo do mesmo princípio, Yen e Lai da Universidade Nacional de Cheng Kung em Taiwan publicaram um estudo utilizando siRNA IDO específica administrado na pele de animais com tumores de bexiga e cólon e observaram um aumento no número de linfócitos $CD8^+$ no microambiente tumoral associado a menor crescimento tumoral e melhor sobrevida[67].

Os inúmeros agentes terapêuticos que vem sendo estudados em fase de teste experimental e mesmo de estudos clínicos nos mostram que não existe um agente realmente eficaz no tratamento antitumoral. Na prática, observamos que de todos os agentes imunoterápicos empregados, uma resposta eficaz com aumento de sobrevida é obtido em somente cerca de 10 a 30% dos casos. Neste sentido, os estudos com inibitores da IDO e siRNA parecem mostrar resultados promissores, entretanto somente os estudos clínicos mostrarão a real eficácia desses agentes como imunorreguladores e inibidores do crescimento tumoral[66,67].

# 3. OBJETIVOS DO ESTUDO

## 3. Objetivos do Estudo

### 3.1 Primários

**A**. Verificar se os TCTB expressam a enzima Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) e qual o padrão de expressão.

**B**. Verificar se a expressão da IDO no tumor primário é uma variável preditiva tanto de metástase quanto de óbito em pacientes portadores de TCTB submetidos à ressecção cirúrgica.

### 3.2 Secundários

**C.** Caracterizar e quantificar a população de linfócitos intratumorais através da detecção de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$.

**D**. Verificar se o nível de infiltração linfocítica tumoral é uma variável preditiva tanto de metástase quanto de óbito em pacientes portadores de TCTB submetidos à ressecção cirúrgica.

**E**. Verificar a existência de associação entre infiltração intratumoral de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ com os níveis de expressão da IDO.

# 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

# 4. Casuística e Métodos

## 4.1 Casuística e desenho do estudo

Trata-se de estudo de coorte retrospectivo no qual foram incluídos 64 pacientes portadores de TCTB com e sem metástases, submetidos à ressecção cirúrgica com linfadenectomia intrapulmonar e mediastinal (mínimo de 5 linfonodos) no período de 1981 até o final de 2003. Todos os pacientes selecionados fizeram acompanhamento ambulatorial por cinco anos no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da FMUSP e Hospital Georges Pompidou na França. Foi estabelecido um banco de dados com diversas informações sobre cada paciente como dados epidemiológicos, clínicos relacionados à doença, cirúrgicos e anatomopatológicos considerados relevantes e importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi aprovado pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq ) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP, em sessão de 05.11.08, sob número 0934/08. Este trabalho obteve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com processo de número 2008/55707-3.

### 4.1.1 Critérios de Exclusão do estudo

Foram excluídos do estudo todos os pacientes cujo material histológico em bloco de parafina foi considerado inapropriado ou inadequado para a análise imunohistoquímica. Também foram excluídos aqueles pacientes portadores de Síndromes de Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEM) e aqueles pacientes não submetidos à linfadenectomia ou tiveram menos de 5 linfonodos intrapulmonares e mediastinais ressecados no ato operatório.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Coleta de dados

À revisão dos prontuários foram recuperados os seguintes dados:

I. Idade (no ato operatório)
II. Gênero
III. Localização do tumor em relação à carina (central ou periférico)
IV. Tipo de ressecção cirúrgica
V. Estadiamento TNM (*Tumor, Node, Metastasis*)
VI. Presença de metástases linfonodais
VII. Presença de metástases à distância
VIII. Tempo de sobrevida e ocorrência de óbito

Os dados coletados foram baseados nos estudos prévios realizados pelo Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da FMUSP. As variáveis então consideradas não significantes quanto à ocorrência de metástases, como diâmetro e volume tumorais, não foram incluídas neste estudo.

Os dados dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP foram coletados tanto por revisão dos prontuários como através de entrevistas ambulatoriais para complementação de lacunas de importância para o estudo. Os dados dos pacientes do Hospital Georges Pompidou da Universidade de Paris VI foram todos coletados pelos respectivos prontuários.

### 4.2.2 Processamento Histológico e Imunohistoquímico

#### 4.2.2.1 Processamento Histológico

O material histológico de todos os pacientes incluídos no estudo foram disponibilizados em blocos de parafina tamponada com fixação prévia em

formalina a 10%. Lâminas correspondentes foram obtidas do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e Hospital George Pompideou para análise e revisão que foram realizadas por dois patologistas experientes na área de patologia pulmonar, conhecedores dos critérios preconizados pela Organização Mundial da Saúde da classificação histológica dos tumores de pulmão, baseado no subtipo histológico predominante identificado na maioria das áreas. A análise foi procedida de maneira cega, ou seja, nenhum dos patologistas conhecia o diagnóstico dado previamente. As lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina (H&E) foram analisadas ao microscópio óptico. Nos casos onde ocorreu discordância no diagnóstico foi estabelecida uma análise conjunta, com três revisores, para obtenção de consenso no diagnóstico.

#### 4.2.2.2 Processamento Imunohistoquímico

Para fins de análise imunohistoquímica foram montados cortes de 3 µm de espessura de cada bloco de tumor primário com o uso de um micrótomo e o tecido colocado sobre lâmina de microscopia pré-preparada com silano sem realização de coloração. O processo de silanização foi realizado da seguinte forma: as lâminas foram mergulhadas sequencialmente em uma cuba com álcool, duas com acetona e mais duas com silane (SIGMA A3648) por 5 minutos no total. Como última etapa do processo procedeu-se com mais dois banhos em duas cubas com acetona e em seguida em duas cubas com água destilada. O processamento desse material foi realizado no laboratório de Imunohistoquímica da FMUSP sendo utilizados os seguintes anticorpos e reagentes:

I. Anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD4 (NCL-CD4-1F6), Novocastra (UK).
II. Anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD8 (NCL-CD8-295), Novocastra (UK).

III. Anticorpo monoclonal de camundongo anti-Indoleamine 2, 3-dioxigenase (ab55305), Abcam (USA).
IV. Isotipo IgG1 de camundongo (ab18448), kappa monoclonal, controle negativo para anti-CD4 e anti-CD8, Abcam (USA).
V. Isotipo IgG2b de camundongo (ab18421), kappa monoclonal, controle negativo para anti-indoleamine 2,3 dioxigenase, Abcam (USA).
VI. Kit Novolink Max Polymer Detection System (RE7280-K), Novocastra, (UK) – Sistema universal de amplificação por polímeros.

O processamento das lâminas com os respectivos anticorpos anti-IDO, anti-$CD4^+$ e anti-$CD8^+$, foi realizado conforme detalhamos abaixo:

a. A **desparafinização** das lâminas foi procedida colocando-se as lâminas inicialmente em xilol quente (à temperatura de 60 – 65º C) por 15 à 20 minutos e então mergulhando-se as lâminas em 3 banhos de xilol frio.
b. Seguiu-se então ao processo de **hidratação** – as lâminas foram mergulhadas em banhos de álcool a 100%, 95% e 70% sequencialmente, sendo então lavadas em água corrente e água deionizada.
c. A **digestão ou recuperação dos antígenos** foi feita através do método de calor úmido com alta temperatura (panela de pressão – 1 minuto a 125ºC). Para tal, as lâminas foram colocadas em solução de Citrato 10 mM, pH 6,0 , para os anticorpos anti-Idoleamine 2,3 dioxigenase e anti-$CD8^+$, e em solução de EDTA pH8,0, para o anticorpo anti-$CD4^+$.
d. Para o **bloqueio da peroxidase endógena** as lâminas foram mergulhadas em água oxigenada de 10 Volumes (3%) e metanol volume à volume, durante 10 minutos, sendo então lavadas em água corrente e por último em água destilada. Repetiu-se então as mesmas etapas prévias exceto pela alteração do metanol pela azida sódica a 1%, sendo o material então lavado com PBS por 3 minutos.
e. O **bloqueio de reações inespecíficas** foi feito através do bloqueio de imunoglobulinas inespecíficas, mergulhando-se as lâminas em caseína 2,5% por 5 min.

f. Na etapa seguinte, realizou-se a incubação por 18-20 horas das lâminas com os **anticorpos primários** diluídos em BSA nas seguintes concentrações: anti-IDO (1:1500), anti-CD8 (1:200) e anti-CD4(1:400). Após lavagem do material com PBS procedeu-se com a incubação em câmara úmida com o polímero Novolink Max Polymer, à temperatura de 37°C, por 30 min. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e colocadas em solução de cromógeno por 5 minutos (70 mg de DAB para 100 ml de tris-HCL com 30 microlitros de Água Oxigenada 30 volumes). Para visualização do núcleo foi utilizado o corante hematoxilina por 1 minuto e as lâminas então lavadas em água corrente.
g. Como último passo o material foi colocado em suporte adequado e desidratado em álcool a 70%, 90% e 100% sequencialmente, com duração de cerca de 1 minuto cada. As lâminas foram então diafanizadas em xilol por 1 minuto e montadas com lamínulas e resinas sintéticas.

### 4.2.3 Análise Imunohistoquímica

#### 4.2.3.1 Determinação da expressão da IDO

##### 4.2.3.1.1 Análise Semi-quantitativa da IDO

A análise semi-quantitativa foi determinada através de uma quantificação por escore, analisando-se dez campos de grande aumento (CGA) aleatórios de cada lâmina, obtendo-se então uma média para cada caso. Para cada GCA, foram analisadas cerca de 500 células, totalizando 5000 células para cada caso. O grau de intensidade da expressão da IDO variou de 0 a 3, sendo 0 - ausência expressão da IDO, 1 – expressão de leve intensidade, 2 – expressão de moderada intensidade, 3 – expressão de forte intensidade. O escore final de cada CGA foi obtido através da somatória dos valores do número de células multiplicado pelo seu respectivo grau de intensidade de expressão da IDO. O escore mínimo foi de 0 e o

máximo de 1500, que representa forte intensidade de expressão da IDO em todas as células analisadas.

#### 4.2.3.1.2 Análise Quantitativa da IDO

A análise quantitativa da IDO foi determinada por histomorfometria através do software de análise de imagens Image Pro Plus 5 (Figura 2). Este método é geralmente usado para comparação ou em substituição ao método semi-quantitativo[68].

As lâminas foram identificadas através de codificação com o intuito de possibilitar a análise cega dos dados evitando assim um viés de interpretação precoce do trabalho. A aquisição das imagens para análise digital foi obtida com o Microscópio de Fluorescência Comum Olympus BX 51 e câmera digital Q color 5.

Inicialmente foram fotografadas todas as lâminas em aumento de 400x, com padronização de tempo de exposição e luminosidade. Após, procedeu-se com a análise das imagens. Um ajuste de contraste padronizado para todas as imagens permitiu uma melhor diferenciação de cores de cada estrutura. Em seguida prosseguiu-se com a avaliação da amplitude de cor dessas estruturas através de histogramas o que permitiu a caracterização individual das mesmas. Um histograma padrão foi utilizado para análise de todas as imagens (Figura 3). Após as padronizações necessárias, procedeu-se com a leitura das imagens pelo sistema de absorção de cor RGB (red, green e blue) que foi expresso em valores numéricos absolutos, variando de 0-255, que corresponde ao espectro da luz, sendo zero – ausência de cor ou preto e 255 a associação de todas as cores ou branco. Estes valores foram obtidos como média geral dos três valores de RGB da imagem, e utilizados para análise quantitativa da IDO (Figura 4).

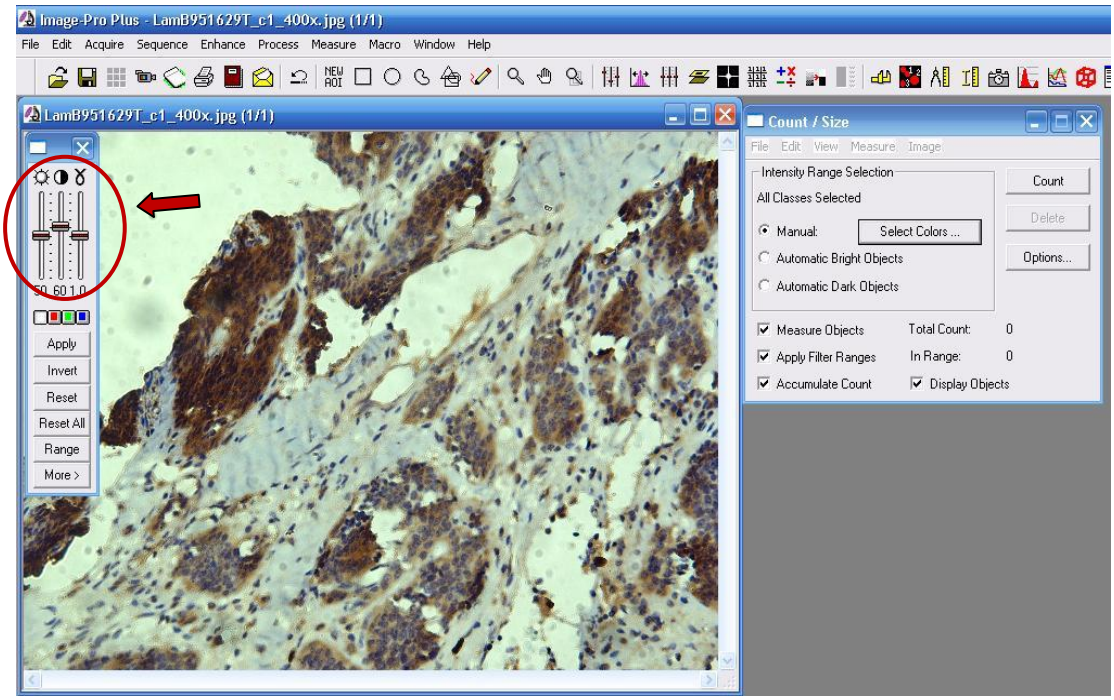


**Figura 2 – Fotografia de lâmina do caso n.60 (400x) adquirida com o software Image Pro Plus 5 mostra ajuste e padronização de luminosidade, tempo de exposição e contraste .**

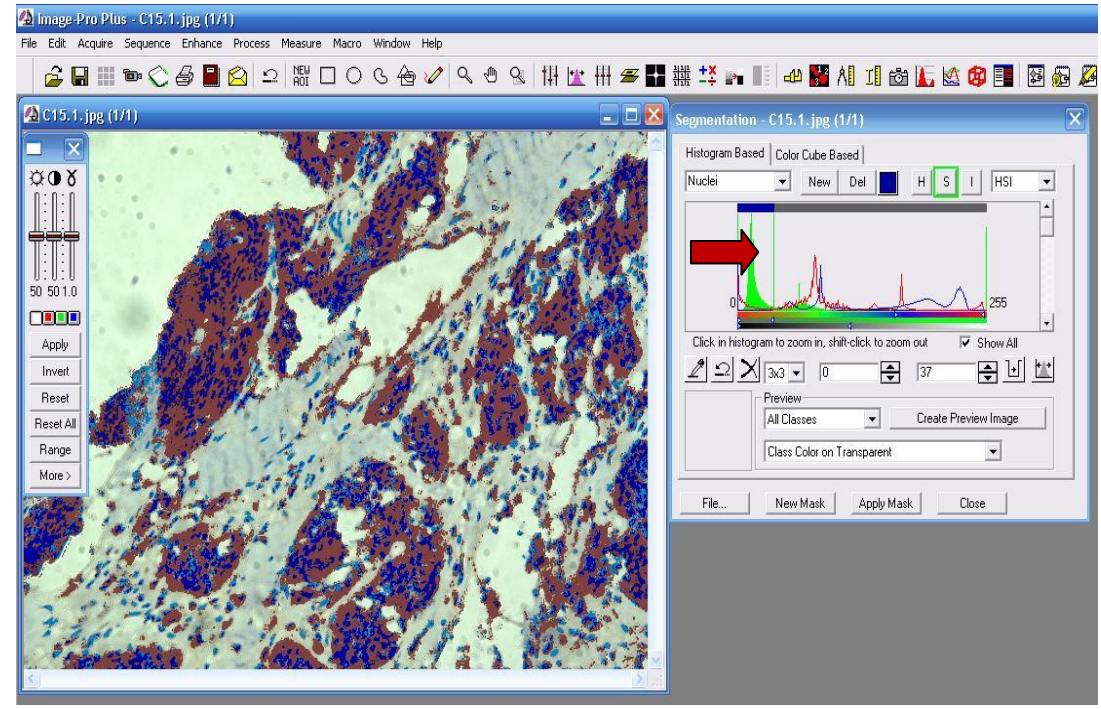


**Figura 3 – Fotografia de lâmina do caso n.60 (400x) mostra a análise digital das imagens com segmentação das cores através de histogramas.**

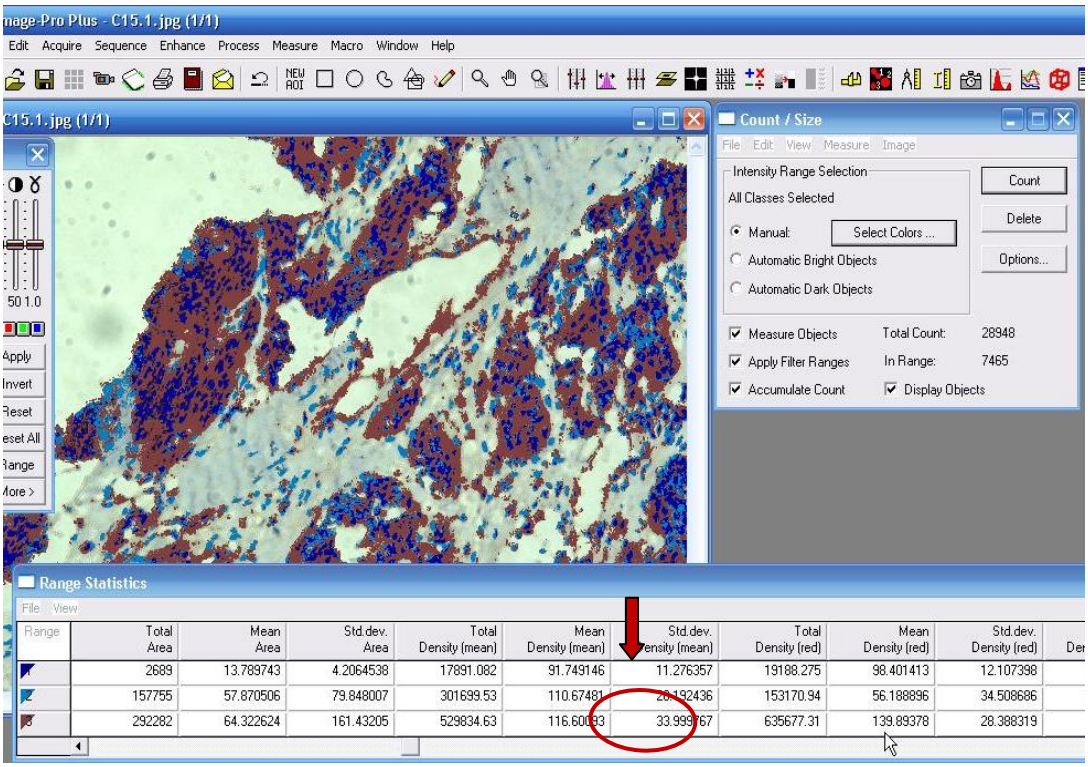


**Figura 4 - Fotografia de lâmina do caso n.60 (400x) evidencia a determinação da intensidade de expressão da IDO pela média de absorção de RGB.**

### 4.2.3.2 Quantificação de Linfócitos T CD8$^+$e CD4$^+$

Os linfócitos intratumorais foram quantificados por histomorfometria utilizando-se a técnica de *point counting* ou contagem de pontos onde a leitura é realizada sob microscopia ótica com aumento de 400x utilizando-se um retículo contendo cem pontos e cinquenta retas. Todas as células positivas sob a interseção de retas e pontos foi considerada na quantificação da contagem total de células. Foram contatos 10 campos aleatórios totalizando 1000 pontos e uma área de 62.500µm$^2$ do tecido tumoral sendo então obtida uma média para cada caso e uma média geral em todos os grupos.

A contagem peritumoral dos linfócitos não foi realizada devido a heterogeneidade das amostras de tecido tumoral.

### 4.2.4 – Análise Estatística

O programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) 17 foi utilizados para a análise estatística.

Procedeu-se inicialmente com a análise de distribuição dos dados onde cada variável contínua e discreta foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com sensibilização pela Correção de Lilliefors. As variáveis com distribuição normal foram expressas como média como medida de tendência central e erro padrão como medida de dispersão. Àquelas com distribuição assimétrica foram representadas pela mediana como medida de tendência central e pelo intervalo interquartis 25 a 75% como medida de dispersão.

#### 4.2.4.1 Análise Univariada

Para as comparações entre duas populações amostrais com medidas não pareadas e distribuição normal, utilizou-se o teste t de Student e para os dados com distribuição assimétrica, o teste U de Mann-Witney.

As comparações de três ou mais populações com medidas não pareadas e distribuição assimétrica foram realizadas através do teste de Kruskal Wallis associada à comparação múltipla de Dunn.

Para as variáveis categóricas utilizou-se o teste Chi-quadrado de Pearson para a comparação entre freqüências. Nos casos em que 20% ou mais dos grupos apresentaram valor esperado abaixo de 5 foi utilizado o teste da razão de verossimilhança para análise estatística mais acurada[69].

O valor limite de p para o erro tipo I foi de cinco por cento. Nos testes aplicáveis o nível de significância escolhido foi o bicaudal e intervalo de confiança de 95%.

A análise de correlação entre variáveis foi realizada através do teste de Spearman.

Para eleger variáveis candidatas à inclusão no modelo multivariado foi utilizado o corte de 10% para o valor de p para o erro tipo I, com o objetivo de diminuir a probabilidade de exclusão de variáveis que possam ter influência sobre os fenômenos a serem preditos devido a um eventual erro do tipo II.

#### 4.2.4.2 Análise Multivariada

O modelo de predição de risco individual escolhido para o estudo foi o de regressão logística, com método de inclusão das variáveis independentes de forma condicional, em degraus e de forma progressiva, sendo realizado para cada fenômeno a ser predito uma análise em separado.

O nível de p para o erro do tipo I foi considerado de cinco por cento.

Os fenômenos escolhidos para predição de risco foram metástase linfática ou hematogênica e óbito.

# 5. RESULTADOS

# 5. Resultados

Os resultados da análise dos 64 casos de TCTB selecionados para o estudo são mostrados através da descrição da casuística seguida pela análise estatística.

## 5.1 Pacientes

### 5.1.1 Idade

A idade do total de 64 pacientes variou de 1 a 74 anos, com distribuição normal apresentando média de 42.6 e erro padrão de 2.0.

### 5.1.2 Gênero

A distribuição dos indivíduos com relação ao gênero foi de 56% (36/64) para o gênero feminino e 44% (28/64) para o gênero masculino, sendo que a proporção homem:mulher foi de 1:1,3.

### 5.1.3 Localização Tumoral

A maioria dos pacientes estudados (76,5% dos casos - 49/64) apresentou tumoração de origem central, e apenas 28% (15/64) apresentou tumoração periférica.

### 5.1.4 Tipo de Ressecção Cirúrgica

A ressecção cirúrgica para tratamento dos TCTB realizada com maior freqüência foi a lobectomia**,** 65% dos casos (42/64), seguida pela bilobectomia e pneumectomia em 16% (10/64) e 11% (7/64) dos casos, respectivamente. Os procedimentos realizados com menor freqüência foram

a broncoplastia e a segmentectomia em 5% (3/64) e 3% (2/64), respectivamente (figura 5).

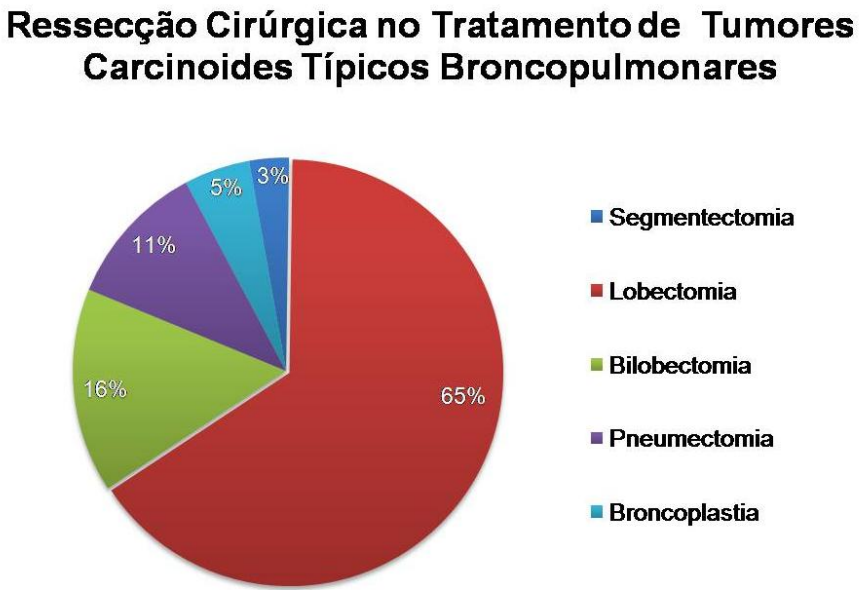


**Figura 5 - Gráfico dos Procedimentos cirúrgicos empregados no tratamento de tumores carcinoides típicos broncopulmonares versus freqüência de realização em porcentagem.**

### 5.1.5 Estadiamento TNM

Todos os pacientes deste estudo foram inicialmente classificados segundo a classificação TNM – 6.edição. Tendo em vista futuros estudos e equivalência no sistema de estadiamento possibilitando adequada comparação de amostras, procedeu-se com a reclassificação dos casos conforme o novo sistema de estadiamento de neoplasias pulmonares TNM – 7ª edição. Muito embora tenha ocorrido *downstaging* e *upstaging* nos grupos com e sem metástases, respectivamente, nenhuma alteração significativa que pudesse interferir nas análises deste trabalho foi identificada. A tabela comparativa das classificações mencionadas é evidenciada em detalhes na tabela 1 (Anexos).

Dos 64 pacientes estudados, 61% (39/64) dos casos foram classificados como estadio I (37,5% - IA e 23,5% - IIB). Os demais casos foram classificados como se segue: estadio II – 22%(14/64) dos casos (14% - IIA e 8% - IIB); estadio III – 11% (7/64) dos casos (11% - IIIA) e 6%(4/64) dos casos foram classificados com estadio IV ( 1,5% - IVA e 3% - IVB). Em 1,5% dos casos não foi possível recuperar o sítio de metástase hematogênica, seja em prontuário ou por entrevista (Tabela 2).

**Tabela 2 – Estadiamento global dos casos estudados pela classificação TNM – 7ª edição**

| Estadiamento | Casos com Metástase | Casos sem Metástase | Total casos | % Casos |
|---|---|---|---|---|
| IA | 0 | 24 | 24 | 37,5 |
| IB | 0 | 15 | 15 | 23,5 |
| IIA | 5 | 4 | 9 | 14 |
| IIB | 1 | 4 | 5 | 8 |
| IIIA | 7 | 0 | 7 | 11 |
| IIIB | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IVA | 1 | 0 | 1 | 1,5 |
| IVB | 2 | 0 | 2 | 3 |
| IV* | 1 | 0 | 1 | 1,5 |

*** Sítio de metástase não identificado**

### 5.1.6 Metástase Linfática

A ressecção linfonodal intrapulmonar e mediastinal foi realizada em todos os casos selecionados. A mediana de linfonodos ressecados por paciente foi de 6,5, sendo que em 90% (58/64) dos casos foram ressecados de 5 a 15 linfonodos durante o ato operatório. A análise histopatológica

evidenciou metástase linfonodal em 14 (22%) do total de casos estudados. Um desses casos apresentou metástase hematogênica concomitante. Oito pacientes foram classificados como N1 e 6 pacientes como N2.

Todos os pacientes foram submetidos a seguimento tomográfico anual por 5 anos após ressecção cirúrgica do tumor primário. Os pacientes sem linfonodomegalia mediastinal com mais de 1 cm de diâmetro neste período de seguimento foram considerados sem metástase linfática.

### 5.1.6 Metástase Hematogênica

Quatro (6,2%) dos 64 casos estudados mostraram metástase hematogênica, havendo um caso de metástase linfonodal concomitante.

Foi possível a identificação do sítio metastático em 3 dos 4 casos: dois pacientes apresentaram metástase à distância para o fígado e parótida, respectivamente, e outro paciente apresentou metástase intratorácica para o lobo pulmonar contralateral. Em um dos casos não possível a recuperação da informação sobre o sítio de metástase.

As metástases hematogênicas foram investigadas através de seguimento tomográfico anual dos sítios mais freqüentes de metástase, durante os 5 anos de seguimento após ressecção cirúrgica do tumor primário. As imagens compatíveis com metástase foram submetidas à confirmação histológica após biópsia ou ressecção cirúrgica.

### 5.1.7 Sobrevida e Óbitos

Dos 64 casos selecionados, não houve nenhum óbito relacionado aos TCTB.

A análise dos dados evidenciou 5% (3/64) de óbitos nesta casuística, 2 em decorrência de causa não relacionada à TCTB (um caso devido à sepsis e outro por infarto agudo do miocárdio no 3.dia e 24.mês pós-operatório,

respectivamente). Houve um caso em que não foi possível identificar a causa do óbito, permanecendo como causa indeterminada.

Todos os demais pacientes permaneceram vivos nos 5 anos de seguimento do estudo.

## 5.2 Análise Univariada

A análise univariada das variáveis idade, gênero, localização tumoral e infiltração linfocitária foi realizada através da comparação dos casos de TCTB sem metástase e casos com qualquer tipo de metástase, seja hematogênica, linfática ou ambas, sendo portanto designado como grupo com metástase. Para análise mais detalhada da variável intensidade de expressão da IDO, subdividimos os 64 casos em 4 grupos distintos:

Grupo 1 - TCTB sem metástase;

Grupo 2 - TCTB com metástase (qualquer tipo de metástase);

Grupo 3 - TCTB apenas com metástase linfática;

Grupo 4 - TCTB apenas com metástase hematogênica

### 5.2.1 Idade x Metástase

A análise comparativa dos grupos com TCTB com e sem metástase, no que se refere à idade, evidenciou médias de 44,3 e 42 e erro padrão de 3,6 e 2,4,respectivamente. O teste *t* de Student para amostras não pareadas não evidenciou diferença significante entre os grupos, com p=0,62 (tabela 3).

**Tabela 3 – Variável Idade como Fator Preditivo de Metástase em Tumores Carcinoides Típicos Broncopulmonares**

| Idade/Grupo | Com Metástase | Sem Metástase | p |
|---|---|---|---|
| Média ± EP | 44,3±3,6 | 42±2,4 | 0,62 |

### 5.2.2 Gênero x Metástase

A análise dos grupos com e sem metástase não evidenciou diferença entre o gênero feminino e masculino com relação à ocorrência de metástase – tabela 4. A relação entre homens:mulheres com e sem metástase foi de 1:1,1 e 1:0,7, respectivamente. O teste Qui quadrado de Pearson evidenciou p=0,37.

**Tabela 4 - Variável Gênero como Fator Preditivo de Metástase em Tumores Carcinoides Típicos Broncopulmonares**

| Gênero/Grupo | Com Metástase | Sem Metástase |
|---|---|---|
| Masculino | 9 | 19 |
| Feminino | 8 | 28 |
| **Total** | **17** | **47** |

### 5.2.3 Localização Tumoral x Metástase

Quanto à variável localização tumoral, também não houve diferença significante na comparação entre grupos com e sem metástase. O teste Qui quadrado de Pearson evidenciou p=0,17 (tabela 5).

**Tabela 5 - Variável Localicação Tumoral como Fator Preditivo de Metástase em Tumores Carcinoides Típicos Broncopulmonares**

| Localização Tumoral/Grupo | Com Metástase | Sem Metástase |
|---|---|---|
| Central | 11 | 38 |
| Periférica | 6 | 9 |
| **Total** | **17** | **47** |

### 5.2.4 Óbito x Metástase

Dos dados coletados não foi evidenciado nenhum óbito relacionado aos TCTB. Mesmo os pacientes com presença de metástase linfática ou hematogênica permaneceram vivos durante os 5 anos de seguimento deste estudo. Desta forma, não foi possível qualquer análise relacionada ao óbito.

### 5.2.5 Intensidade de Expressão da Indoleamine 2,3 Dioxigenase (IDO) versus Metástase

#### 5.2.5.1 Análise Semi-Quantitativa

Todos os 64 casos selecionados para o estudo apresentaram expressão da IDO em diferentes graus de intensidade. A análise de campos aleatórios de grande aumento de cada caso mostrou presença da IDO em mais de 80% das células tumorais.

A figura 6 (B-D) corresponde a imagens de lâminas de diferentes casos de TCTB coradas por imunohistoquímica com diferentes padrões de expressão da IDO. Como controles negativos foram utilizados a Imunoglobulina IgG2 , em substituição ao anticorpo anti-IDO conforme sugerido pelo fornecedor Abcam. Os tecidos utilizados como controles positivos e negativos foram linfonodos e pulmão.

A análise semi-quantitativa da expressão da IDO nos grupos 1 e 2 não mostrou qualquer diferença significante entre os mesmos quando submetidos ao test *t* de Student. As médias e erro padrão dos referidos grupos foram 780,1 ± 56,56 e 779,7 ± 38,52, respectivamente, com p= 0,99 (figura 7). O mesmo foi observado na comparação dos grupos 1 e 3 (figura 8), e nos grupos 1 e 4 (figura 9). As médias e erro padrão dos grupos 3 e 4 foram 796 ± 68,9 e 728,8 ± 98,18, respectivamente.

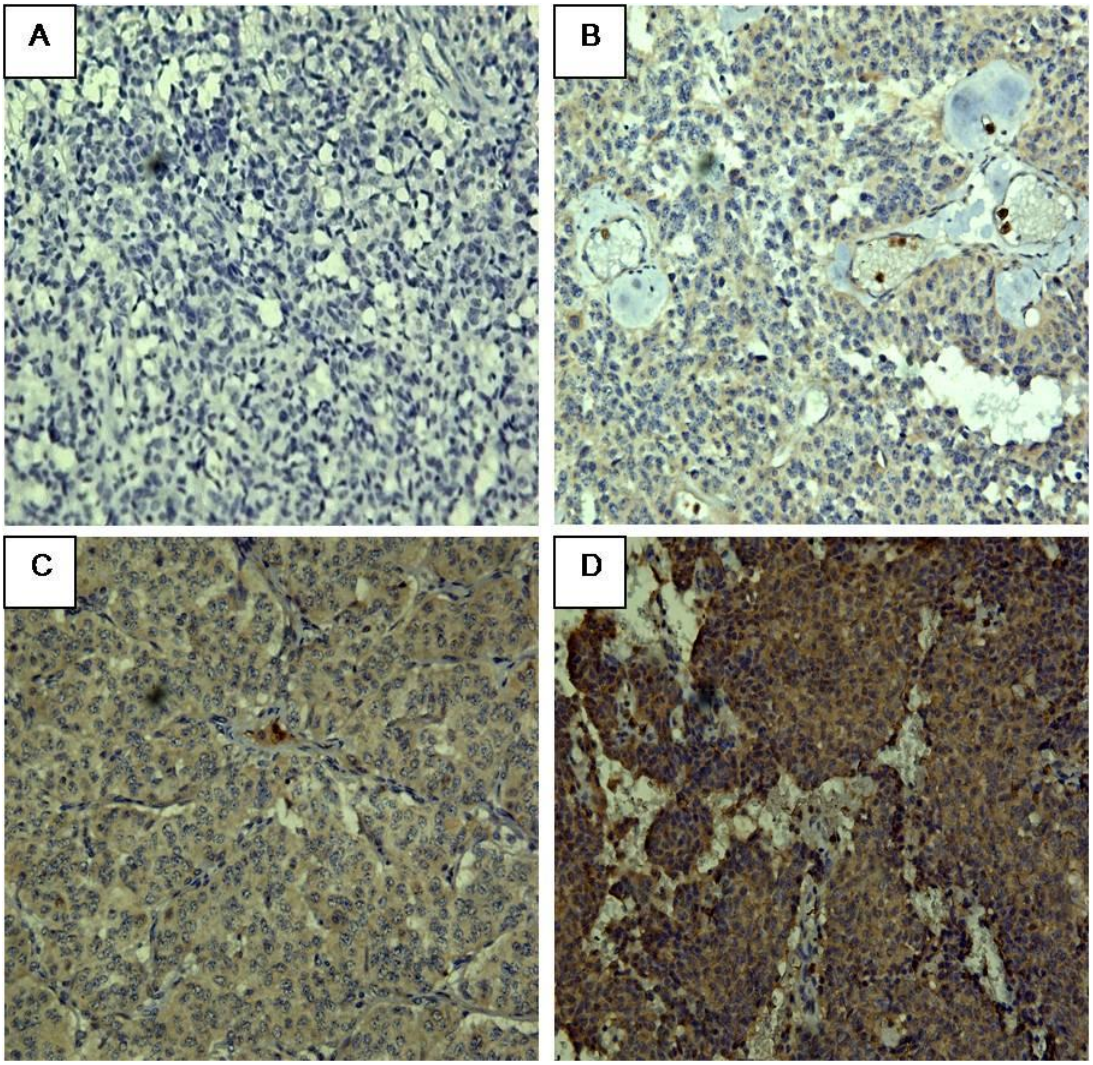


**Figura 6 - Imunoexpressão da Indoleamine 2,3 Dioxigenase em Tumores Carcinoides Típicos Broncopulmonares (TCTB). 5A – Controle negativo com IsotipoIgG2. 5 B-D –TCTB marcados com anti-IDO evidenciando diferentes graus de intensidade de expressão: em 5B (fraca), 5C (moderada) e 5D (intensa). Coloração - Núcleo em azul e IDO em marrom. Aumento de 400x.**

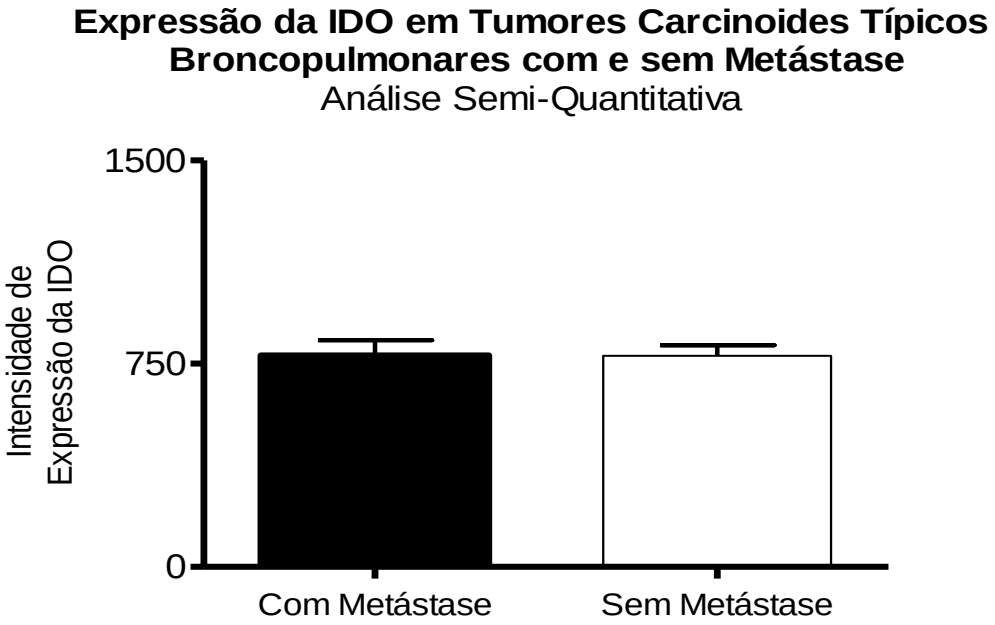


**Figura 7 – Gráfico da Análise Semi-Quantitativa da Intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos scores de intensidade nos TCTB com e sem metástase. Teste *t* Student/ p=0,99.**

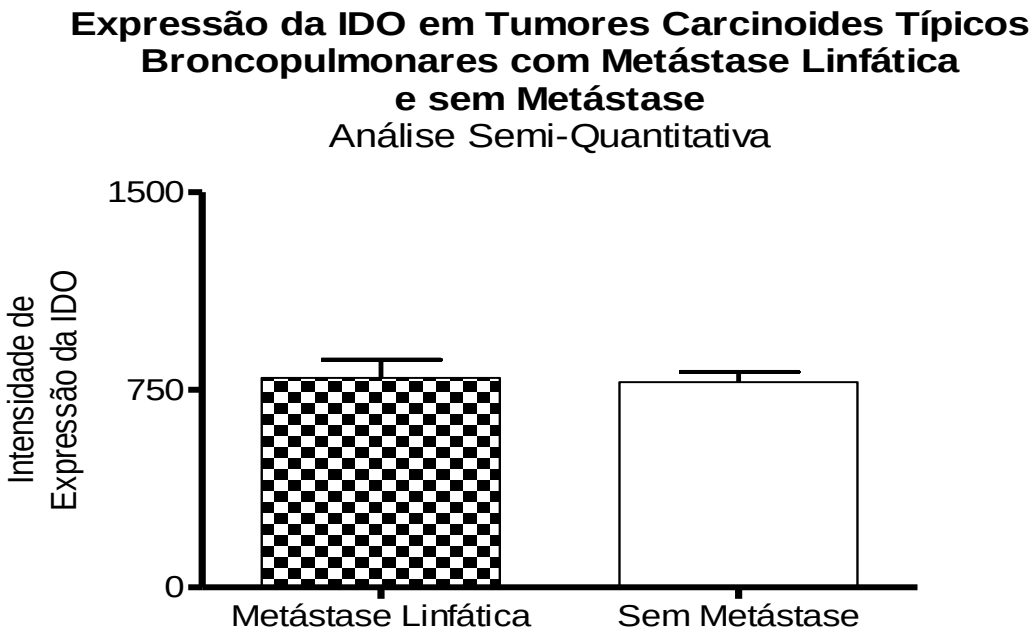


**Figura 8 – Gráfico da Análise Semi-Quantitativa da Intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos scores de intensidade nos TCTB com metástase linfática e sem metástase .Teste *t* Student/ p=0,84.**

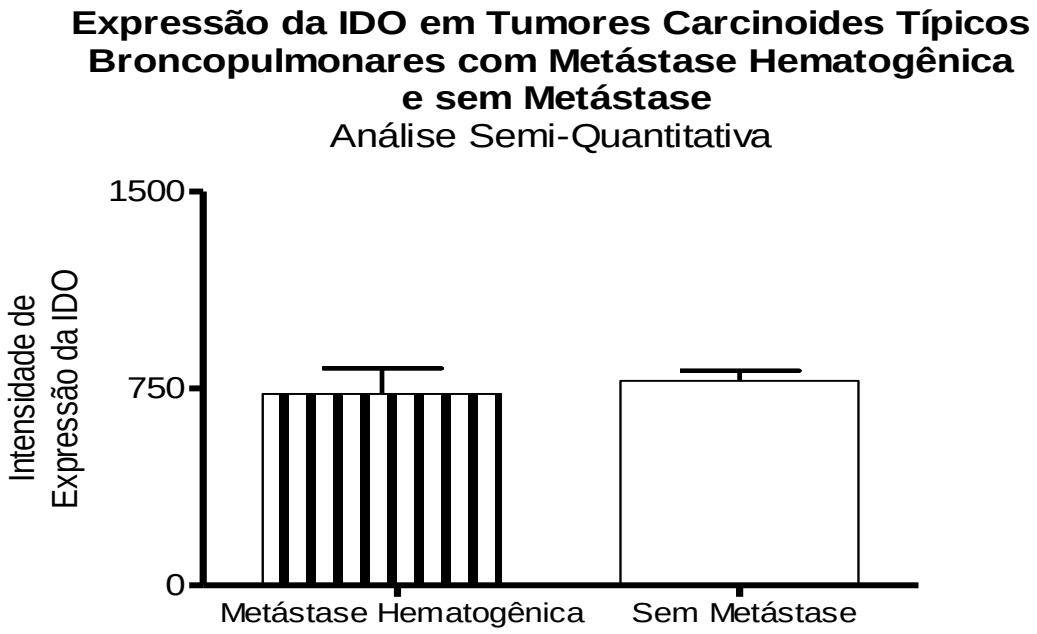


**Figura 9 – Gráfico da Análise Semi-Quantitativa da Intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos scores de intensidade nos TCTB com metástase hematogênica e sem metástase.Teste *t* Student/ p=0,70.**

### 5.2.5.2 Análise Quantitativa

Para análise quantitativa da expressão da IDO utilizou-se o número absoluto das médias RGB de cada grupo como previamente descrito em materiais e métodos. Os valores obtidos foram submetidos ao teste t Student não sendo evidenciado nenhuma diferença significante entre os grupos 1 e 2 (figura 10 ), 1 e 3 (figura 11) e 1 e 4 (figura 12). As médias e erro padrão obtidos são mostrados como se segue: grupo 1: 130,8 ± 2,90; grupo 2: 127,3 ± 1,72; grupo 3: 131,6 ± 3,74 e grupo 4: 126,0 ± 1,58.

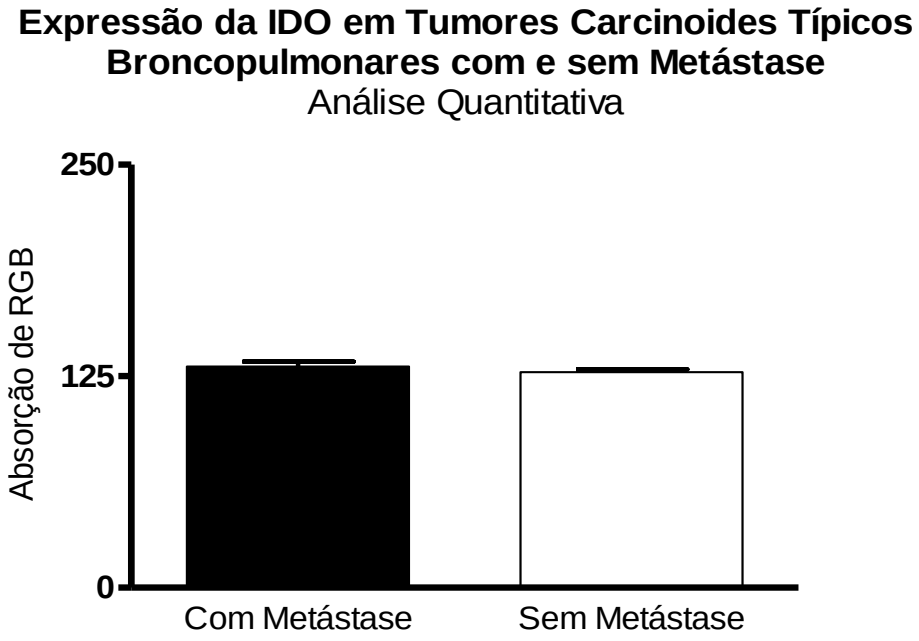


**Figura 10 – Gráfico da Análise Quantitativa da Intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos valores de absorção RGB nos TCTB com e sem metástase . Teste *t* Student/ p=0,30.**

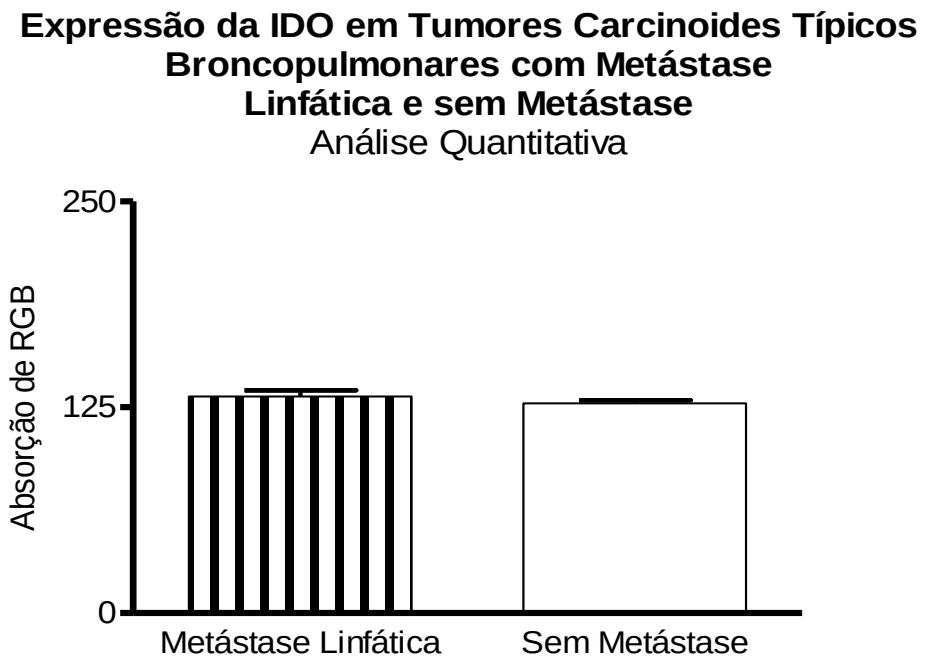


**Figura 11 – Gráfico da Análise Quantitativa da Intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos valores de absorção RGB nos TCTB com metástase linfática e sem metástase. Teste *t* Student/ p=0,28.**

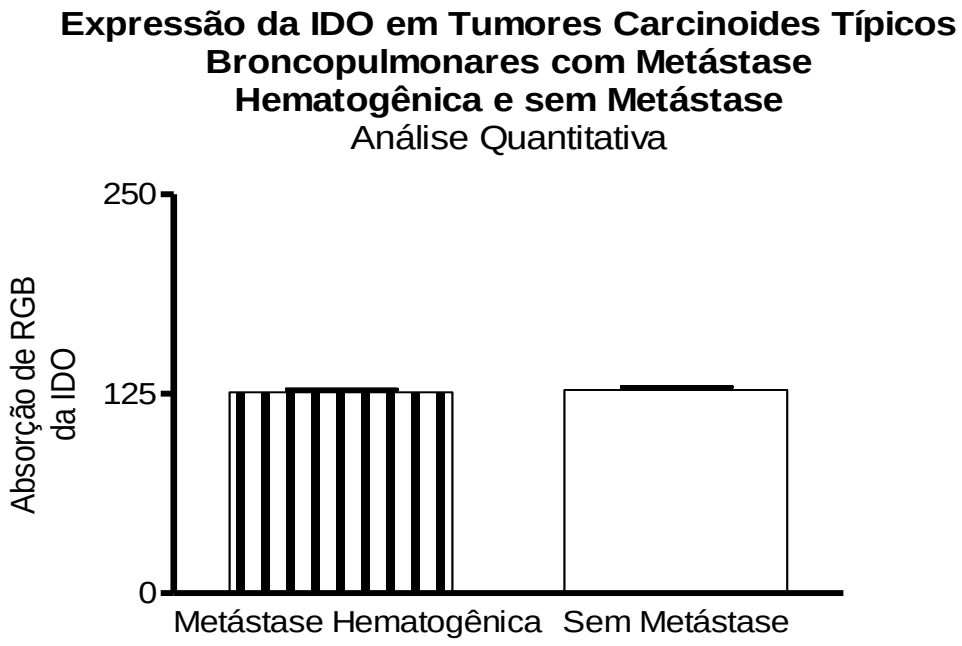


**Figura 12 – Gráfico da Análise Quantitativa da Intensidade de expressão da IDO representada pela média ± erro padrão dos valores de absorção RGB nos TCTB com metástase hematogênica e sem metástase .Teste *t* Student/ p=0,82**

### 5.2.6 Infiltração Linfocitária Intratumoral x Metástase

A quantificação dos linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$ foi realizada conforme detalhado previamente em materiais e métodos . Os resultados obtidos mostraram infiltração linfocitária intratumoral nos TCTB com predominância de linfócitos T $CD8^+$ em comparação com os linfócitos T $CD4^+$ ($p<0.01$) em todos os grupos estudados.

Não foi encontrada diferença significante entre os grupos com e sem metástase para os linfócitos T $CD8^+$ (figura 13), onde p=0,98. Entretanto, diferença significante foi identificada na quantificação dos linfócitos T $CD4^+$ dos grupos com e sem metástase, cujo p=0,01 (figura 14) e nos grupos com metástase linfática e sem metástase, p= 0,02. As medianas observadas na comparação dos grupos 1 e 2 (sem e com metástase) quanto à quantificação de linfócitos T $CD4^+$, foram de 0,0 e 0,05, respectivamente, e

0,2 para ambos os grupos, na quantificação de linfócitos T $CD8^+$. A análise comparativa do grupo $CD4^+$ em relação à ocorrência de metástase evidenciou correlação positiva pelo teste de Spearman, com r=0,31.

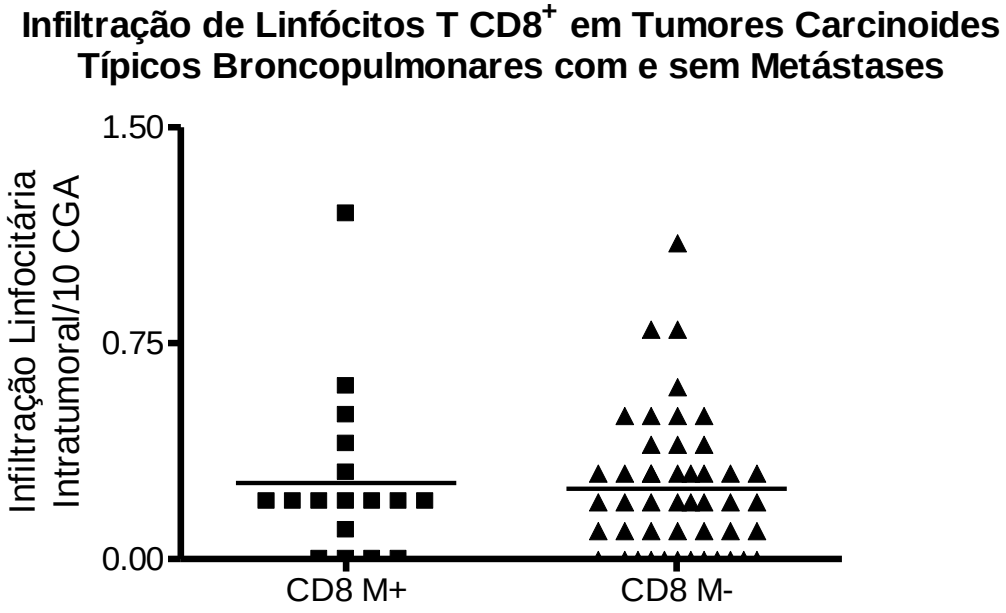


**Figura 13 - Gráfico da Infiltração de Linfócitos T $CD8^+$ Intratumoral em TCTB com (M+) e sem (M-) metástases, representados pela mediana dos valores obtidos em cada grupo. CGA: campos de grande aumento. Teste de Mann-Whitney. p=0,98.**

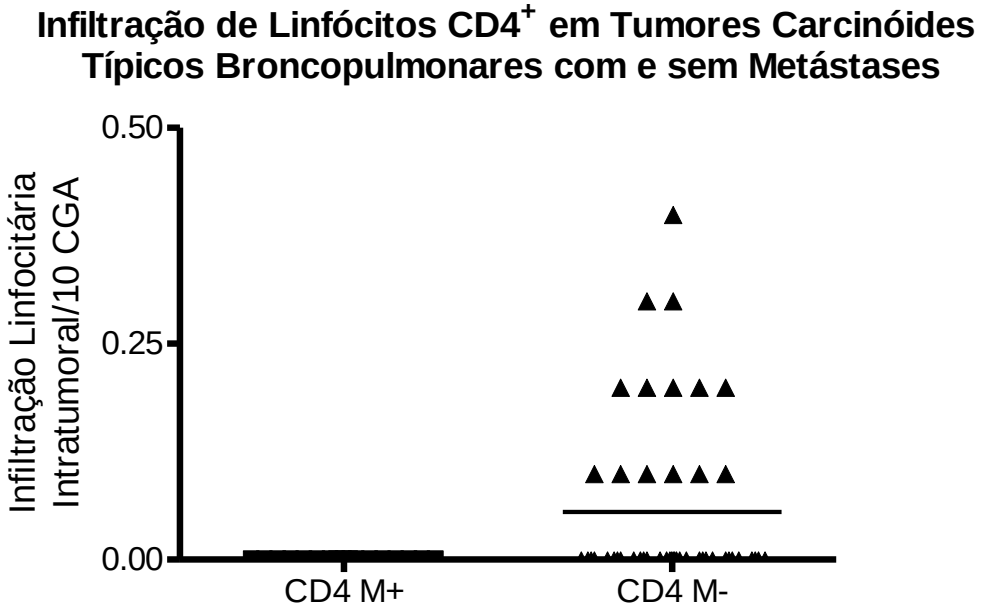


**Figura 14 - Gráfico da Infiltração de Linfócitos T CD4$^+$ Intratumoral em TCTB com (M+) e sem (M-) metástases, representados pela mediana dos valores obtidos em cada grupo. CGA: campos de grande aumento. Teste de Mann-Whitney. p=0,012.**

### 5.2.7 Infiltração Linfocitária Intratumoral x IDO

Análise complementar foi realizada para detecção de correlação entre os grupos de infiltração linfocitária intratumoral (CD8$^+$ e CD4$^+$) e a intensidade de expressão da IDO pelas análises semi-quantitativa e quantitativa.

A análise do grupo CD8$^+$ versus IDO (semi-quantitativa) evidenciou valor de r=-0,2 porém com p=0,1 (figura 15), demonstrando inexistência de correlação entre essas variáveis. Da mesma forma a análise quantitativa não evidenciou qualquer associação entre as variáveis CD8$^+$ e IDO ( r=0 e p=0,5).

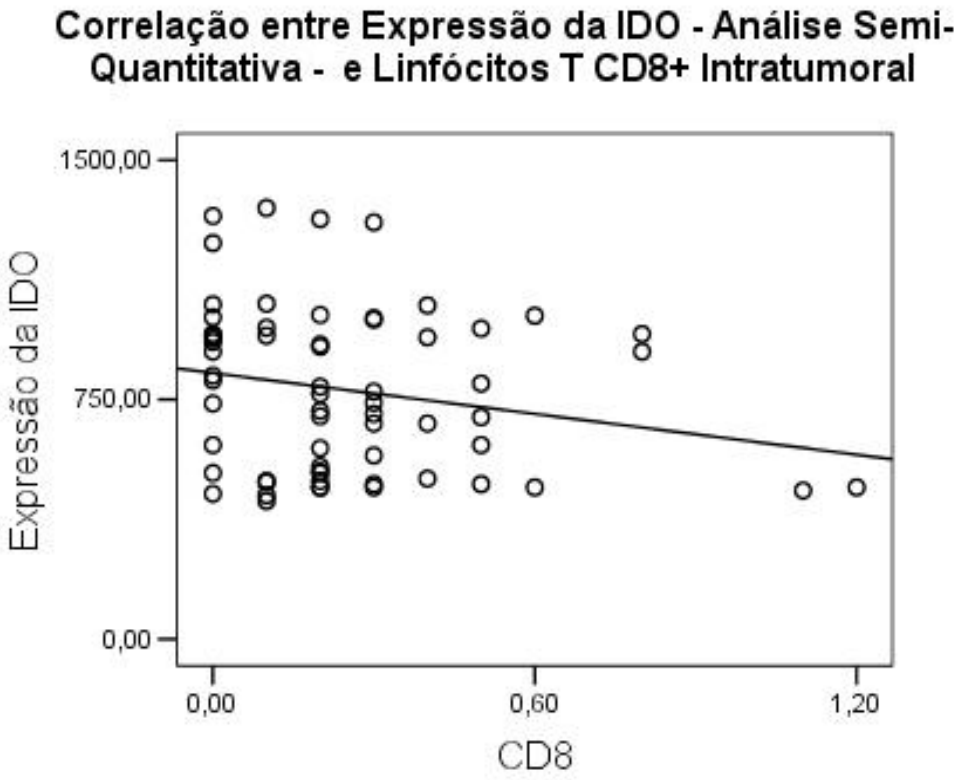


**Figura 15 - Gráfico da Correlação entre Intensidade de Expressão da IDO por análise semi-quantitativa versus Infiltração de Linfócitos T CD8$^+$ Intratumoral em TCTB. Teste de Spearman, r=-0,2**

Resultados semelhantes foram obtidos quando da comparação do grupo CD4$^+$ versus IDO. A análise semi-quantitativa mostrou ausência de correlação entre as variáveis com r=-0,2 e p=0,1 (figura 16). Resultados semelhantes foram encontrados através da análise quantitativa, com r=0,1 e p=0,4.

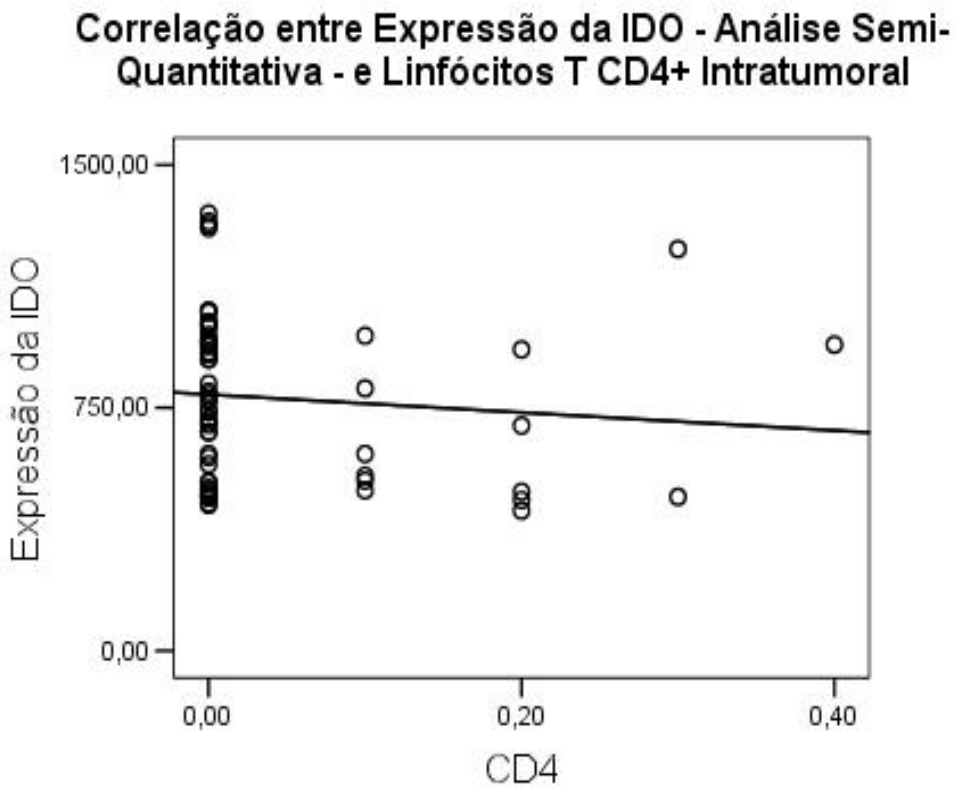


**Figura 16 - Gráfico da Correlação entre Intensidade de Expressão da IDO por análise semi-quantitativa versus Infiltração de Linfócitos T CD4$^+$ Intratumoral em TCTB. Teste de Spearman, r=-0,2.**

## 5.3 Análise Multivariada por Regressão Logística

De acordo com a metodologia descrita previamente, determinamos como valor de corte considerável aceitável para o erro tipo α, o valo de $p<0.1$. De todas as variáveis estudadas na análise univariada apenas a contagem de linfócitos T CD4$^+$ mostrou diferença estatisticamente significante com valor de $p<0.1$. Desta forma não foi possível a realização da análise multivariada por regressão logística.

# 6. DISCUSSÃO

# 6. DISCUSSÃO

A discussão deste trabalho consiste em duas partes: a primeira visando uma abordagem crítica sobre as limitações deste estudo seguido pela discussão dos resultados propriamente ditos.

## 6.1 Limitações do Estudo

### 6.1.1 Desenho do estudo

Todo trabalho retrospectivo apresenta dificuldades inerentes ao modelo de estudo. Especificamente nesta tese, o modelo empregado foi uma coorte retrospectiva, sendo o principal questionamento referente à uniformidade dos dados a serem analisados. O estudo mais próximo do ideal neste caso seria uma coorte prospectiva onde o melhor controle da coleta das informações e a padronização dos procedimentos realizados possibilitaria uma maior uniformização dos dados. Entretanto, a raridade dos TCTB e a importância do estudo do comportamento desses tumores justifica a análise retrospectiva dos dados obtidos que, se devidamente avaliados, podem fornecer valiosas informações, possivelmente com aplicabilidade clínica.

### 6.1.2 Coleta de Dados

Embora tenha sido estabelecida uma ficha padrão para a coleta de dados dos pacientes participantes deste e dos demais estudos do grupo de TCTB do Hospital das Clínicas FMUSP e do Hospital George Pompidou de Paris - França, alguns dados não puderam ser obtidos seja através do prontuário, seja por entrevista ambulatorial. Neste último caso a baixa escolaridade de alguns pacientes e familiares dificultou a coleta adequada de algumas informações.

### 6.1.3 Dissecção Linfonodal Hilar e Mediastinal

Conforme mencionado previamente, uma das dificuldades de trabalhos retrospectivos refere-se ao controle e padronização dos procedimentos em estudo. Neste trabalho o período estudado foi de 1981 a 2003 – portanto, duas décadas de tratamento dos TCTB sendo que até início de 2000 acreditava-se que esses tumores apresentavam comportamento benigno e que não apresentavam metástases, não sendo então necessária a linfadenectomia mediastinal radical mas apenas amostragem linfonodal [15,16,17,18]. No Hospital George Pompidou de Paris, a linfadenectomia radical é realizada de rotina para tratamento dos TCTB há vários anos. Porém no Hospital das Clínicas da FMUSP a amostragem linfonodal, até meados da última década, era o procedimento mais comumente empregado já que até então não havia sido publicado na literatura evidências de malignidade ou metástase associados aos TCTB. Muito embora estudos tenham mostrado que esses tumores tem potencial maligno, ainda não se tem evidências de que a linfadenectomia radical proporcione melhor sobrevida aos pacientes. Diante disso, todos os pacientes submetidos à linfadenectomia hilar e mediastinal seja radical ou por amostragem, de no mínimo 5 linfonodos, foram incluídos neste estudo. Desta forma excluímos 63 pacientes selecionados inicialmente para o estudo na tentativa de manter a amostra deste trabalho mais homogênea e tentar eliminar o viés de seleção dos pacientes.

### 6.1.4 Exames de Imagem

Outra limitação do trabalho consiste na falta de padronização nos exames de imagem utilizados para seguimento dos pacientes durante os 5 anos de pós-operatório. Certamente houve aperfeiçoamento tecnológico com melhoria na qualidade das imagens dos estudos tomográficos, entretanto, como já mencionado previamente, pela raridade dos TCTB e para que se tivesse número suficiente de eventos ou ocorrência de

metástase, neste e nos demais estudos do grupo optou-se por manter os pacientes tratados desde o ano de 1981. Como já mencionado em materiais e métodos, o critério utilizado para diagnóstico de comprometimento hilar e mediastinal linfonodal no seguimento pós-operatório foi a presença de adenomegalia maior que 1 cm no maior diâmetro. Sabe-se que mesmos os linfonodos com estas dimensões podem apresentar células neoplásicas porém o controle evolutivo da doença muito provavelmente mostraria aumento progressivo dos linfonodos caso houvesse comprometimento neoplásico. Outra alternativa seria a realização do octreoscan de rotina durante os 5 anos de seguimento deste estudo, entretanto este exame tornou-se indisponível por um período significativo do nosso seguimento ambulatorial impossibilitando sua utilização como auxílio diagnóstico.

### 6.1.5 Óbitos durante o seguimento

Os pacientes que apresentaram óbitos não relacionados à doença também foram incluídos nas análises deste estudo por já apresentarem metástase na época do procedimento operatório, diagnosticado no intra-operatório e confirmado através do estudo anatomopatológico, não havendo portanto, interferência na avaliação da ocorrência do evento em estudo. Não pode ser realizada análise de mortalidade e sobrevida neste estudo pela ausência de óbitos relacionados aos TCTB.

## 6.2 Análise dos Resultados

### 6.2.1 Casuística x Metástase

Embora alguns artigos publicados na literatura tenham evidenciado uma predominância do evento estudado em indivíduos mais idosos e do gênero masculino, a casuística deste estudo não evidenciou nenhuma correlação destas variáveis com a ocorrência de metástase. Dos diversos trabalhos do grupo de TCTB do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das

Clínicas da FMUSP, quatro foram desenvolvidos como tese de doutorado[12,14,73,74]. Embora tenha sido evidenciado o gênero masculino [12] e idade [73] como variáveis preditivas de metástase em TCTB, cada qual com diferenças significantes em duas teses independentes, tal resultado não foi observado nos demais trabalhos do grupo. Esta diferença nos resultados pode ser atribuída ao fato dos pacientes selecionados serem diferentes. Os pacientes brasileiros selecionados, em geral, são mais jovens do que os pacientes europeus com certa predominância de mulheres o que pode provocar um viés de seleção mostrando o gênero masculino como fator preditivo de metástase. Embora seja esperado que a idade avançada seja fator de pior prognóstico assim como para as demais neoplasias pulmonares, tal variável não apresentou diferença significativa consistente durante os estudos do grupo de TCTB. De acordo com os achados na literatura [3,13,14,20], a maioria dos trabalhos publicados analisou concomitantemente grupos de pacientes portadores de tumores carcinóides típicos e atípicos o que certamente promoveu um viés de seleção e resultados discutíveis já que os carcinóides atípicos tendem a ocorrer em indivíduos mais idosos e evoluir com pior prognóstico. Certamente um fator adicional de confusão consiste na categorização aleatória da variável idade o que foi eliminado nesta tese visando diminuir possíveis erros de análise das variáveis. Com relação ao gênero, os resultados dos artigos publicados também são variáveis.

Com relação à localização tumoral, observou-se neste estudo, predominância das lesões tumorais em região central na árvore traqueobrônquica. Entretanto esta variável não foi identificada como fator preditivo de metástase nos TCTB.

O reestadiamento dos casos estudados, segundo a classificação TNM 7. edição teve por objetivo promover a uniformização dos dados para futuras comparações com outros estudos sobre TCTB. Foi observado nesta casuística, *upstaging* (IB para IIA) e *downstaging* (IIB para IIA) no grupo sem e com metástase, respectivamente, devido à subclassificação de cada estadio com apropriada valorização do tamanho tumoral. Além disso, houve

subclassificação dos casos de estadio IV em IVA (metástase intratorácica) e IVB (metástase à distância). Apesar dessas alterações no novo sistema de classificação TNM para neoplasias pulmonares, no caso dos TCTB a alteração se restringe à classificação tumoral e prognóstica apenas, sem refletir alterações na terapêutica já que o tratamento neoadjuvante ou adjuvante nesses tumores tem pouca ou nenhuma resposta.

A incidência de metástase dos TCTB encontrados nesta casuística (metástase linfática ou hematogênica: 20% e 5%, respectivamente e linfático-hematogênica:1,5%) corrobora com os resultados já evidenciados pela literatura e também com os trabalhos previamente publicados pelo grupo de TCTB do Hospital das Clínicas da FMUSP cuja incidência de metástase linfática foi de 12 a 20% e de metástase hematogênica, de 2 a 11%[12-19].

### 6.2.2 Expressão da IDO x Metástase

Vários estudos publicados mostram que a enzima IDO pode ser expressa por diferentes neoplasias com diversos graus de malignidade[36-38,56-61]. Neste trabalho observou-se que a maioria das células (>80%) dos TCTB apresentou coloração positiva para a IDO com expressão quase sempre homogênea em um mesmo caso e de intensidade moderada na maioria dos casos estudados.

Considerando-se que os controles positivos internos (macrófagos e linfócitos) e externos (tecido linfático e pulmão) e os controles negativos internos (cartilagem e hemáceas) e externos (isotipo como anticorpo primário em tecido linfático e pulmonar) foram adequadamente estabelecidos e revisados quando da análise de cada caso, assume-se que realmente a técnica de imunohistoquímica foi adequadamente realizada e os resultados são confiáveis. Apesar disso, embora seja possível determinar a presença da enzima IDO no citoplasma celular através desta técnica, não é possível determinar a funcionalidade da mesma. Para tanto seria necessária a utilização de técnicas de mensuração da atividade enzimática, como por

exemplo a cromatografia líquida de alto desempenho, que utiliza amostras frescas do material a ser analisado. As amostras deste estudo foram disponibilizadas em blocos de parafina impossibilitando tal análise. Em geral, tais estudos são realizados *in vitro* pela evidente dificuldade de conservação do material estudado e rápida degradação enzimática. Outra alternativa já utilizada em alguns estudos, seria a medida indireta da atividade da IDO através da dosagem sérica do triptofano e seus metabólitos. Entretanto, pelo modelo de estudo empregado, também não possível ter acesso a este tipo de material ou amostra.

A fim de tentar identificar qualquer diferença no processo de quantificação da expressão da IDO, procedeu-se com duas formas de análise: a primeira, semi-quantitativa e mais subjetiva, já que é observador dependente e baseada num sistema já padronizado de escore de intensidade de coloração, bastante difundida na literatura[75,76]. A segunda, uma análise quantitativa e mais objetiva, também reconhecida pela literatura e bastante utilizada pelos patologistas[68], dependendo apenas da padronização da análise de intensidade de cores através de software específico para este fim. Ambos os métodos demonstraram resultados semelhantes, sendo os níveis de IDO semelhantes nos grupos submetidos à análise comparativa. Isto talvez se deva ao fato das evidências mostrarem que altos níveis de expressão da IDO estão relacionados à pior prognóstico e menor sobrevida[56-58]. A presença da expressão da IDO nos TCTB em níveis moderados pode representar alguma atividade imunomoduladora nesses tumores porém não como mecanismo principal de escape tumoral, favorecendo a ocorrência de metástase. Segundo Munn et al[77], o principal efeito imunomodulador da IDO ocorre nos linfonodos regionais onde células apresentadoras de antígenos expressando esta enzima impedem a resposta linfocitária favorecendo a progressão tumoral e a sobrevivência de células metastáticas. Entretanto, esta hipótese não foi estudada neste trabalho.

### 6.2.3 Infiltração Linfocitária Intratumoral x Metástase

O interesse inicial na determinação do padrão de infiltração linfocitária intratumoral deveu-se ao fato de não haver nenhum trabalho na literatura correlacionando infiltração linfocitária em TCTB, acrescentando-se ao fato de uma das hipóteses deste estudo consistir na imunomodulação pela enzima IDO promovendo inibição da infiltração linfocitária intratumoral contribuindo assim com a ocorrência de metástase.

Pelo grau de agressividade dos TCTB, esperava-se encontrar quantidade mínima ou mesmo ausente de infiltração seja de linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$. A razão disto seria pelo fato dos tumores menos agressivos, apresentarem número menos expressivo de mutação genética, sendo então considerados menos imunogênicos. Quando as neoplasias apresentam baixo número de antígenos de superfície relacionados ao tumor, desencadeiam resposta imune menos intensa, representada por proliferação linfocitária deficiente e baixa produção de citocinas[78].

Além disso, a maioria dos trabalhos [79,80] demonstra predominância de infiltração de linfócitos T $CD8^+$ em comparação aos linfócitos T $CD4^+$ no microambiente tumoral, mostrando ainda correlação com a taxa de infiltração linfocitária com prognóstico e sobrevida dos pacientes portadores de diferentes tipos de neoplasia. Aqueles com maior número de linfócitos intratumorais conseguem impedir ou retardar o crescimento tumoral.

A análise desta tese evidenciou baixo número de infiltração intratumoral como previamente suposto. A predominância de linfócitos, corroborando os trabalhos citados, foi de células T $CD8^+$. Porém não foi evidenciada qualquer diferença na taxa de infiltração de linfócitos T $CD8^+$ entre os grupos com e sem metástase. Já a quantificação dos linfócitos T $CD4^+$ intratumoral evidenciou resultados interessantes. A presença de linfócitos nos casos com metástase foi nula, enquanto os casos sem metástase apresentaram infiltração linfocitária significativamente maior.

Esses achados sugerem que os linfócitos T $CD4^+$ tem efeito protetor nos casos sem metástase, de alguma forma contribuindo para a inibição da

progressão tumoral e ocorrência de metástase nos TCTB. Porém o papel dos linfócitos T $CD4^+$ no contexto da imunorregulação é bastante complexo. Sabe-se esses linfócitos são constituídos por diversos subtipos como os linfócitos T *helper* 1, 2, 3 e 17 e linfócitos T reguladores[78]. Esses linfócitos possuem até mesmo papéis antagônicos no processo da resposta imune e mecanismos de interação dos mesmos no microambiente tumoral ainda encontra-se sob investigação. De qualquer forma, os linfócitos T $CD4^+$ tem papel fundamental na ativação da resposta imune humoral e citotóxica pois são essas células que iniciam o reconhecimento de antígenos tumorais através das células apresentadoras de antígenos e a partir da interação com moléculas MHC classe II e produção de citocinas, promovem a reação imune humoral e coestimulação dos linfócitos T citotóxicos ou T $CD8^+$.

A semelhança nos níveis de infiltração de linfócitos T $CD8^+$ intratumoral entre os grupos analisados sugere mais uma vez uma via alternativa na regulação do escape tumoral. Talvez através de imunomodulação pela IDO via linfonodos regionais ou mesmo por outro mecanismo com efeito supressor local com ação direta nos linfócitos T $CD4^+$. Estudos complementares são necessários para esclarecimento destas questões.

### 6.2.4 Correlação entre IDO e Infiltração Linfocitária Intratumoral

Segundo as considerações iniciais deste trabalho, a IDO poderia estar envolvida na imunorregulação dos TCTB com concomitante modulação de linfócitos justificando assim a mínima infiltração linfocitária intratumoral encontrada nesses tumores. Porém os resultados obtidos mostraram, pela análise semi-quantitativa e quantitativa, a inexistência de correlação entre os níveis de expressão da IDO e infiltração intratumoral de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Embora os valores de r tenham demonstrado valores sugestivos de fraca correlação entre essas variáveis, os valores de p não foram significantes.

Apesar disso, os artigos publicados mostram evidências consistentes do efeito imunomodulador da IDO nos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Acredita-se que a existência de outros mecanismos imunomoduladores tanto quanto a modulação linfocitária através de linfonodos regionais, justifique tais resultados. Outro trabalho do nosso grupo desenvolvido como tese de doutorado mostrou que micrometástases eventualmente causam macrometástases. Cerca de 50% dessas micrometástases são eliminadas pelo sistema imune e não se observa evolução para macrometástase ou mesmo metástases detectáveis clinicamente. Talvez, fenômenos como a neoangiogênese, conforme estudos de Mandriotta, tenha influência no evento metastático e contribuam para este processo.

### 6.2.5 Análise Multivariada por Regressão Logística

À análise univariada, apenas a variável infiltração intratumoral de linfócitos T $CD4^+$ mostrou diferença significante entre os grupos comparados sendo associado mais especificamente à ocorrência de metástase linfática, termo esse utilizado devido ao fato de todos os casos com metástase linfática apresentarem esse diagnóstico na época do procedimento operatório e avaliação anatomopatológica. Não foram observadas metástases linfáticas durante os 5 anos de seguimento, apenas metástases hematogênicas. Em vista disso, o termo mais apropriado consiste na associação entre níveis de linfócitos T $CD4^+$ e metástases e não predição de risco.

Todas as demais variáveis analisadas neste estudo apresentaram $p>0,1$. Sendo p igual ou menor que 10% o valor previamente estabelecido como ponto de corte na tentativa de selecionar todos os fatores que pudessem ter alguma influência na ocorrência do evento estudado, não foi possível a realização da análise multivariada por regressão logística como inicialmente proposto.

# 7. CONCLUSÕES

## 7. CONCLUSÕES

A. Existe a presença da enzima Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) em tumores carcinoides típicos broncopulmonares.

B. A expressão da IDO no tumor primário não mostrou-se como variável preditiva de metástase nos portadores de tumor carcinoide típico broncopulmonar.

C. Há mínima infiltração intratumoral tanto de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ sendo a infiltração predominante de linfócitos T $CD8^+$.

D. Não foi identificado correlação entre a infiltração linfocitária intratumoral e os níveis de expressão da IDO.

E. O nível de infiltração tumoral de linfócitos $CD4^+$ foi identificado como variável associada a ocorrência de metástase nos tumores carcinoides típicos broncopulmonares, mais especificamente nas metástases linfáticas.

F. A relação entre as variáveis IDO, linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ e óbito não pode ser estudada devido à inexistência de óbitos relacionados aos tumores carcinoides típicos broncopulmonares durante o período de seguimento do estudo.

# 8. ANEXOS

## 8.1 Anexos A

**Tabela 1 – Comparação por Grupos e Subgrupos do Estadiamento TNM – 6ª e 7ª edição**

| Estadiamento | 6ª ed | 7ª ed |
|---|---|---|
| IA | 24 | 24 |
| IB | 19 | 15 |
| IIA | 3 | 9 |
| IIB | 7 | 5 |
| IIIA | 7 | 7 |
| IIIB | 0 | 0 |
| IVA | - | 1 |
| IVB | - | 2 |
| IV* | 4 | 1** |
| Total Casos | 64 | 64 |

*** Classificação TNM 6ª edição – sem divisão por subgrupos**

**** Sítio de Metástase Indeterminado**

## 8.2 Anexo B

**Tabela 5 – Dados Clínicos e Histopatológicos dos Pacientes Incluídos no Estudo**

| n | País Origem | Gênero | Idade | Local Tu | Tipo Op | Stat 5a | T | N | M | Estad | LNs Ressec | LNs Pos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | F | 1 | 16 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 23 | 0 |
| 2 | F | 2 | 22 | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | IIA | 17 | 0 |
| 3 | F | 1 | 54 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 6 | 0 |
| 4 | F | 1 | 30 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IA | 6 | 0 |
| 5 | F | 1 | 19 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | IIA | 9 | 0 |
| 6 | F | 2 | 50 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 8 | 0 |
| 7 | F | 1 | 47 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 8 | 0 |
| 8 | F | 1 | 50 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 11 | 0 |
| 9 | F | 1 | 27 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 10 | F | 2 | 66 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | IIA | 5 | 0 |
| 11 | F | 2 | 52 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | IIA | 24 | 0 |
| 12 | F | 1 | 34 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 13 | F | 1 | 52 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 9 | 0 |
| 14 | F | 2 | 28 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 8 | 0 |
| 15 | F | 2 | 36 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 10 | 0 |
| 16 | F | 2 | 64 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 5 | 0 |
| 17 | F | 2 | 57 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 10 | 0 |
| 18 | F | 2 | 57 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 10 | 0 |
| 19 | F | 2 | 29 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 13 | 0 |
| 20 | F | 2 | 45 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 21 | F | 1 | 68 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 8 | 0 |
| 22 | F | 2 | 69 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 11 | 0 |
| 23 | F | 1 | 34 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 8 | 0 |
| 24 | F | 2 | 38 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 6 | 0 |
| 25 | F | 1 | 27 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 5 | 0 |
| 26 | F | 1 | 71 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 27 | F | 2 | 36 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 28 | F | 2 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 5 | 0 |
| 29 | F | 2 | 52 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 6 | 0 |
| 30 | F | 2 | 41 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 8 | 0 |
| 31 | F | 1 | 40 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 7 | 0 |
| 32 | F | 2 | 42 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | IIB | 9 | 0 |
| 33 | F | 2 | 54 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 5 | 0 |
| 34 | F | 2 | 31 | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 6 | 0 |
| 35 | F | 1 | 44 | 0 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 36 | F | 1 | 27 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 6 | 0 |
| 37 | F | 2 | 72 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 6 | 0 |

continua

| n | Pais Origem | Gênero | Idade | Local Tu | Tipo Op | Stat 5a | T | N | M | Estad | LNs Ressec | LNs Pos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 38 | F | 2 | 53 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 5 | 0 |
| 39 | F | 2 | 67 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 8 | 0 |
| 40 | F | 2 | 29 | 0 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 5 | 0 |
| 41 | B | 1 | 62 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 12 | 0 |
| 42 | B | 1 | 17 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | IB | 12 | 0 |
| 43 | B | 2 | 42 | 0 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | IIB | 5 | 0 |
| 44 | B | 2 | 32 | 0 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | IIB | 7 | 0 |
| 45 | B | 1 | 37 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 8 | 0 |
| 46 | B | 2 | 20 | 0 | 5 | 1 | 3 | 0 | 0 | IIB | 8 | 0 |
| 47 | B | 2 | 36 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | IA | 6 | 0 |
| 48 | F | 1 | 65 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | IIIa | 5 | 2 |
| 49 | F | 1 | 30 | 0 | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 | IIIa | 6 | 2 |
| 50 | F | 2 | 47 | 0 | 3 | 1 | 2 | 1 | 0 | IIb | 12 | 2 |
| 51 | F | 2 | 74 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | IIa | 6 | 1 |
| 52 | F | 1 | 55 | 0 | 3 | 1 | 2 | 2 | 0 | IIIa | 5 | 1 |
| 53 | F | 2 | 36 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | IIa | 5 | 1 |
| 54 | F | 1 | 43 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 | IIIa | 5 | 1 |
| 55 | F | 2 | 19 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | IVA | 9 | 0 |
| 56 | F | 2 | 50 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | IVB | 8 | 0 |
| 57 | F | 1 | 44 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | IVB | 6 | 4 |
| 58 | F | 2 | 49 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | IIA | 5 | 1 |
| 59 | B | 2 | 18 | 0 | 4 | 0 | 3 | 1 | 0 | IIIA | 20 | 1 |
| 60 | B | 1 | 42 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | IIIA | 10 | 2 |
| 61 | B | 2 | 42 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | IV | 5 | 0 |
| 62 | B | 1 | 32 | 0 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | IIA | 17 | 1 |
| 63 | F | 1 | 63 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | IIA | 6 | 1 |
| 64 | B | 1 | 45 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | IIIA | 16 | 1 |

conclusão

**Legenda: Gênero – masculino: 1 e feminino: 2 ; Localização Tumoral: Central: 0 e Periférica:1; Tipo Operação: Nodulectomia:0, Segmentectomia: 1, Lobectomia: 2, Bilobectomia: 3, Pneumonectomia: 4 e Broncoplastia: 5; Status (aos 5 anos de seguimento): óbito:0 e vivo:1; LNs Res – Número de Linfonodos Ressecados no Ato Cirúrgico; LNs Pos – Número de Linfonodos Positivos após avaliação anatomopatológica**.

**Nota: Os valores de 1-47 e 48-64 dos anexos B e C representam casos negativos e positivos para metástases, respectivamente.**

## 8.3 Anexo C

**Tabela 7 – Resultados da Análise Imunohistoquímica dos Marcadores IDO e Linfócitos T CD4 e CD8**

| n | IDO SQA | IDO QA | CD8 | CD4 | n | IDO SQA | IDO QA | CD8 | CD4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 118,10 | 1015 | 0,2 | 0 | 33 | 122,80 | 675 | 0,3 | 0 |
| 2 | 119,12 | 465 | 1,1 | 0,2 | 34 | 160,04 | 491 | 0,1 | 0,2 |
| 3 | 134,35 | 607,5 | 0,5 | 0 | 35 | 127,02 | 695 | 0,5 | 0,2 |
| 4 | 134,86 | 607,5 | 0 | 0,1 | 36 | 134,68 | 540 | 0,2 | 0,1 |
| 5 | 131,61 | 705 | 0,3 | 0 | 37 | 129,67 | 945 | 0,4 | 0,4 |
| 6 | 117,95 | 975 | 0,1 | 0 | 38 | 120,54 | 950 | 0 | 0 |
| 7 | 122,80 | 575 | 0,3 | 0 | 39 | 125,76 | 1315 | 0,2 | 0 |
| 8 | 128,12 | 502,5 | 0,4 | 0 | 40 | 129,21 | 450 | 0,1 | 0 |
| 9 | 112,17 | 1045 | 0,4 | 0 | 41 | 128,29 | 1012,5 | 0,6 | 0 |
| 10 | 112,61 | 1240 | 0 | 0,3 | 42 | 115,57 | 455 | 0 | 0 |
| 11 | 120,27 | 485 | 0,5 | 0 | 43 | 133,36 | 825 | 0 | 0 |
| 12 | 129,25 | 485 | 0,3 | 0 | 44 | 113,57 | 922,5 | 0,2 | 0 |
| 13 | 124,80 | 597,5 | 0,2 | 0 | 45 | 127,89 | 475 | 0,3 | 0,3 |
| 14 | 132,33 | 495 | 0,1 | 0,1 | 46 | 126,54 | 950 | 0,5 | 0,1 |
| 15 | 118,39 | 1005 | 0,3 | 0 | 47 | 128,37 | 475 | 0,2 | 0 |
| 16 | 170,14 | 525 | 0,2 | 0,1 | 48 | 134,35 | 475 | 0,1 | 0 |
| 17 | 132,39 | 737,5 | 0 | 0 | 49 | 132,63 | 915 | 0,6 | 0 |
| 18 | 131,67 | 740 | 0,3 | 0 | 50 | 134,79 | 675 | 0,2 | 0 |
| 19 | 123,43 | 900 | 0,8 | 0 | 51 | 131,21 | 1047,5 | 0,2 | 0 |
| 20 | 129,00 | 940 | 0 | 0 | 52 | 122,97 | 475 | 0,4 | 0 |
| 21 | 133,81 | 900 | 0 | 0 | 53 | 129,52 | 475 | 0 | 0 |
| 22 | 107,54 | 1350 | 0,1 | 0 | 54 | 170,00 | 715 | 1,2 | 0 |
| 23 | 123,62 | 520 | 0,2 | 0 | 55 | 138,87 | 775 | 0,2 | 0 |
| 24 | 129,31 | 1050 | 0,1 | 0 | 56 | 125,76 | 697,5 | 0,2 | 0 |
| 25 | 121,12 | 432,5 | 0,1 | 0,2 | 57 | 129,21 | 767,5 | 0,3 | 0 |
| 26 | 104,89 | 1000 | 0,3 | 0 | 58 | 128,29 | 1325 | 0,2 | 0 |
| 27 | 137,82 | 1305 | 0,3 | 0 | 59 | 115,57 | 950 | 0,2 | 0 |
| 28 | 123,28 | 930 | 0 | 0,2 | 60 | 133,36 | 800 | 0 | 0 |
| 29 | 128,08 | 1007,5 | 0 | 0 | 61 | 113,57 | 790 | 0 | 0 |
| 30 | 125,41 | 520 | 0 | 0 | 62 | 127,89 | 955 | 0,5 | 0 |
| 31 | 122,46 | 955 | 0,8 | 0 | 63 | 126,54 | 950 | 0,2 | 0 |
| 32 | 128,99 | 810 | 0 | 0,1 | 64 | 128,37 | 475 | 0 | 0 |

**Legenda: IDO SQA: Níveis de Expressão da IDO pela Análise Semi Quantitativa; IDO QA: Níveis de Expressão da IDO pela Análise Quantitativa.**

# 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 9. BIBLIOGRAFIA


1. Pearson FG, Cooper JD, Deslauriers J, Ginsberg RJ, Hiebert CA, Patterson GA. Thoracic Surgery. 2nd edition, Elsevier, 2002.
2. Shields TW, Locicero J, Ponn RB, Rusch VW. General Thoracic Surgery. vol2, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
3. Bertino EM, Confer PD, Colonna JE, Ross P, Otterson GA. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors: a review article. Cancer. 2009;115(19):4434-41.
4. Laennec RTH. Traité de L'Auscultation Médiate et des Maladies des Poumons et du Couer. 3rd edition, Paris, Chaud, 1831.
5. Zellos S. Bronchial Adenoma.Thorax. 1:61, 1962.
6. Meade RH. Tumors and cysts of the lung. In: A History of Thoracic Surgery. Springfield, Ill: Charles C. Thomas; 1961:175-222.
7. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung.J Thorac Cardiovasc Surg. 1972: 64(3):413-21.
8. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, Hitchcock CL, Cutler GB Jr, Nieman L, Chrousos G, Pass H, Doppman J. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases.Am J Surg Pathol. 1991;15(6):529-53.
9. Travis WD, Sobin LH. Histologic typing of lung and pleural tumours: international histologic classification of tumours (N° 1). New York, NY: Springer-Verlag, 1999.
10. Brambilla E, Travis ED, Colby TV, Corrinz B, Shimosato Y et al. The New World Health Organization classification of Lung Tumours. European Respiratory Journal 2001; 18: 1059–1068.
11. Travis W, Brambilla E, Muller-Hermelink, Harris C. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press; 2004.

12. Das Neves Pereira JC, da Silva AG, Soares F, Ab'Saber AM, Schmidt A, Rodrigues OR, Garippo A, Capelozzi M, de Campos JR, Takagaki T, Jatene FB, Martins S, Capelozzi VL. Nuclear and environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. Pathol Res Pract. 2004;200(6):459-67.
13. Das-Neves-Pereira JC, Bagan P, Milanez-de-Campos JR, Capelozzi VL, Danel C, Jatene FB, Bernaudin JF, Riquet M. Individual risk prediction of nodal and distant metastasis for patients with typical bronchial carcinoid tumors. Eur J Cardiothorac Surg. 2008;34(3):473-7.
14. Moraes-Neto, DM. Prediction of the individual risk of micrometastasis of the bronchopulmonary carcinoid tumors in function of clinical and anatomopathological features and biomarkers. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.
15. Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L et al. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. Ann Thorac Surg. 2004;77(5):1781-5.
16. Fiala P, Petrásková K, Cernohorský S, Kinkor Z, Krepela E, Zatloukal P. Bronchial carcinoid tumors: long-term outcome after surgery. Neoplasm. 2003;50(1):60-5.
17. Kyriss T, Maier S, Veit S, Fritz P, Toomes H, Friedel G. Carcinoid lung tumors: long-term results from 111 resections. Thorac Surg Sci. 2006; 3:Doc03.
18. Thomas CF Jr, Tazelaar HD, Jett JR. Typical and atypical pulmonary carcinoids: outcome in patients presenting with regional lymph node involvement. Chest. 2001;119(4):1143-50.
19. Sigurdardottir JM, Isaksson HJ, Johannsson KB, Jonsson S, Gudbjartsson T. Histology does not accurately predict the clinical behaviour of bronchopulmonary carcinoids - results from an Icelandic population-based study. Laeknabladid. 2008;94(2):125-30.

20. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary Neuroendocrine Tumors. Cancer. 2008;113(1):5-21
21. Farhat CA, Parra ER, Rogers AV, Elian SN, Sheppard MN, Capelozzi VL. Diagnóstico e prognóstico dos tumores pulmonares neuroendócrinos mediante microscopia eletrônica e análise multivariavel de agrupamento. J Bras Pneumol. 2008;34(10):804-11.
22. Faggiano A, Mansueto G, Ferolla P, Milone F, del Basso de Caro ML, Lombardi G, Colao A, De Rosa G. Diagnostic and prognostic implications of the World Health Organization classification of neuroendocrine tumors.J Endocrinol Invest. 2008;31(3):216-23.
23. Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W. Selected markers (chromogranin A, neuron-specific enolase, synaptophysin, protein gene product 9.5) in diagnosis and prognosis of neuroendocrine pulmonary tumours. Pol J Pathol. 2007;58(1):23-33.
24. Oberg K, Janson ET, Eriksson B. Tumour markers in neuroendocrine tumours. Ital J Gastroenterol Hepatol. 1999;31, Suppl 2:S160-2.
25. Rusch VW, Klimstra DS, Venkatraman ES. Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors. Ann Thorac Surg. 1996;62:798-810.
26. Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. Transplant Rev. 1971;7:3-25.
27. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991-8.
28. Du C, Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. J Exp Clin Cancer Res. 2011;30:12.
29. Zou W. Immunosuppressive network in the tumor environment and their therapeutic relevance. Nat Rev Cancer. 2005; 5(4):263-74.
30. Purtilo DT, Linder J. Oncological consequences of impaired immune surveillance against ubiquitous viruses. J Clin Immunol. 1983;3(3):197-206.

31. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. Immunity. 1994;1(6):447-56
32. Van den Broek MF, Müller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. Immunol Rev. 1995;148:5-18.
33. Chamuleau MED, Ossenkoppele, GJ, Van de Loosdrecht AA. MHC class II molecules in tumour immunology: Prognostic marker and target for immune modulation. Immunobiology. 2006; 211(6-8): 619–625.
34. Belladonna ML Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, et al. Immunosuppression Via Tryptophan Catabolism: The Role of kynurenine Pathway Enzymes. Transplantation.2007; 84: 17–20.
35. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science. 1998; 281(5380):1191-3.
36. Löb S, Königsrainer A. Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction? Langenbecks Arch Surg. 2008;393(6):995-1003.
37. Zamanakou M, Germenis AE, Karanikas V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunology Letters. 2007;111(2): 69–75.
38. Munn DH and Mellor AL. IDO and tolerance to tumors. Trends Mol Med. 2004;10(1):15-8.
39. Hage R, Brutel de la Rivière A, Seldenrijk A, van den Bosch JMM et al. Update in Pulmonary Carcinoid Tumors: A Review Article. Annals of Surgical Oncology 2003;10:697–704.
40. Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Neuroendocrine tumors of the lung: clinical, pathologic, and imaging findings. Radiographics. 2006;26(1):41-57.

41. Musi M, Carbone RG, Bertocchi C. Bronchial carcinoid tumours: a study on clinicopathological features and role of octreotide scintigraphy. Lung cancer. 1998;22:97-102.

42. Givens CD Jr, Marini JJ. Transbronchial needle aspiration of a bronchial carcinoid tumor. 985;88(1):152-3.

43. Thivolet-Béjui F.Diagnostic pitfalls in bronchopulmonary tumors. Arch Anat Cytol Pathol.1997;45(5):249-53.

44. Tochigi N, Dacic S, Paul Ohori N. Bronchoscopic and transthoracic cytology and biopsy for pulmonary nonsmall cell carcinomas: Performance characteristics by procedure and tumor type. Diagn Cytopathol. 2011. doi: 10.1002/dc.21588.

45. Filosso PL, Rena O, Donati G, Casadio C, Ruffini E, Papalia E et al. Bronchial carcinoid tumors: surgical management and long-term outcome. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002;123(2):303-9.

46. Fernades, Paulo M. Pégo; Catilho, Luis Gustavo S. I; Gregório, Marcelo G; Janete, Fabio B. Tumor carcinóide: broncotomia como alternativa técnica/ Carcinoid tumor: bronchotomy as a technical alternative. J. pneumol; 25(4): 225-8, 1999.

47. Brokx HA, Risse EK, Paul MA, Grünberg K, Golding RP, Kunst PW, Eerenberg JP, van Mourik JC, Postmus PE, Mooi WJ, Sutedja TG. Initial bronchoscopic treatment for patients with intraluminal bronchial carcinoids. J Thorac Cardiovasc Surg.2007;133(4):973-8.

48. Fuks L, Fruchter O, Amital A, Fox BD, Abdel Rahman N, Kramer MR. Long-term follow-up of flexible bronchoscopic treatment for bronchial carcinoids with curative intent. Diagn Ther Endosc. 2009;2009:782961.

49. Scherübl H, Faiss S, Zeitz M. Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract--diagnosis and therapy. Dtsch Med Wochenschr. 2003;128 Suppl 2:S81-3.

50. Kulke MH, Scherübl H. Accomplishments in 2008 in the management of gastrointestinal neuroendocrine tumors. Gastrointest Cancer Res. 2009;3(5 Supplement 2):S62-6.
51. Höpfner M, Schuppan D, Scherübl H.Treatment of gastrointestinal neuroendocrine tumors with inhibitors of growth factor receptors and their signaling pathways: recent advances and future perspectives. World J Gastroenterol.2008;14(16):2461-73.
52. Karanikas V, Zamanakou M, Kerenidi T, Dahabreh J, Hevas A, Germenis AE et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in lung cancer. Cancer Biol Ther. 2007; 6(8):1258-62.
53. Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, Melioli G, Frumento G. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. Neoplasia. 2005;7(4):390-6.
54. Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Suzuki M, Fujie M, Hahimoto D, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. Lung Cancer. 2010;67(3):361-5.
55. Yasui H, Takai K, Yoshida R, Hayaishi O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonaryindoleamine 2,3-dioxygenase: Its possible occurrence incancer patients Proc Natl Acad Sci USA.1986;83(17):6622-6.
56. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Amberger A et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. Clin Cancer Res. 2006; 12(4):1144-51.
57. Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Kikkawa F.Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with diseaseprogression and survival. Clin Cancer Res. 2008; 14(8):2310-7.

58. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. Clin Cancer Res 2005;11:6030–9.
59. Pan K, Wang H, Chen MS, Zhang HK, Weng DS, Xia JC et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2008;134(11):1247-53.
60. Chen PW, Mellon JK, Mayhew E, Wang S, He YG, Niederkorn JY et al. Uveal melanoma expression of indoleamine 2,3-deoxygenase: establishment of an immune privileged environment by tryptophan depletion. Exp Eye Res. 2007;85(5):617-25.
61. Gao YF, Peng RQ, Li J, Ding Y, Zhang X, Wu XJ, Pan ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhang XS. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. J Transl Med. 2009;7:71.
62. Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. Annu Rev Immunol. 2009;27:83-117.
63. Alexander J. Muller and George C. Prendergast. Marrying Immunotherapy with Chemotherapy: Why Say IDO? Cancer Res 2005;65:8065-8068.
64. Löb S, Königsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? Nat Rev Cancer. 2009;9(6):445-52.
65. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. Cancer Res. 2007;67(2):792-801.
66. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. Nature. 2010;464(7291):1067-70.

67. Yen MC, Lin CC, Chen YL, Huang SS, Yang HJ, Chang CP, Lei HY, Lai MD. A novel cancer therapy by skin delivery of indoleamine 2,3-dioxygenase siRNA. Clin Cancer Res. 2009;15(2):641-9.
68. Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. Clinics. 2006; 61(5):417-24.
69. Motta VT, Filho PFO. SPSS Análise de Dados Biomédicos. Medbook. 1ª ed, 2009.

70. Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, Nambiar PR, Ge Z, Fox JG, Schauer DB. Regulatory Lymphocytes Induce Regression of Intestinal Tumors in *ApcMin/*+ Mice. Cancer Res 2005;65:3998-4004.
71. Muranski P, Restifo NP. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. Curr Opin Immunol. 2009;21(2):200-8.
72. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunol Rev. 2008;222:129-44.
73. Laloni, MT. Predição do risco individual de metástase linfática e hematogênica em função da intensidade da linfangiogênese no tumor carcinóide típico broncopulmonar. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
74. Silva, FM. Expressão de receptores de somatostatina subtipo 2 (SSTR-2) e sua relação com metástase linfática e variáveis clínicas pré-operatórias em tumores carcinóides broncopulmonares típicos. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
75. van Diest PJ, Weger DR, Lindholm J. Reproducibility of subjective immunoscoring of steroid receptors in breast cancer. Anal Quant Cytol Histol. 1996;18(5):351–354.
76. van Diest PJ, van Dam P, Henzen-Logmans SC, Berns E, van der Burg ME, Green J, Vergote I. A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of

Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. J Clin Pathol. 1997;50(10):801-4.

77. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. J Clin Invest. 2004;114(2):280-90.

78. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunol Rev. 2008;222:129-44.

79. Kilic A, Landreneau RJ, Luketich JD, Pennathur A, Schuchert MJ. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. J Surg Res. 2011;167(2):207-10.

80. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Lyberis P, Bruna MC, Macrì L, Daniele L, Oliaro A. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. Ann Thorac Surg. 2009;87(2):365-71; discussion 371-2.

81. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J. 2001;20(4):672-82.