

# Marcadores de diferenciação endócrina para diagnóstico do carcinoma de pequenas células extra-pulmonares

## *Markers of endocrine differentiation in extra - pulmonary small cell carcinoma*

Cyro Teixeira da Silva Junior <sup>1</sup>,  
Gilberto Perez Cardoso <sup>2</sup>, Mauro Zamboni <sup>3</sup>

### RESUMO

**Introdução:** estudos recentes confirmam a natureza endócrina do carcinoma indiferenciado de pequenas células do pulmão bem como das suas apresentações extra-pulmonares. O objetivo do estudo foi comparar a utilidade da Protein Gene Peptide 9.5 (PGP 9.5) com a enzima enolase neurônio específica (NSE), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a calcitonina na diferenciação endócrina do carcinoma indiferenciado de pequenas células extra-pulmonares. **Material e métodos:** análise de dados primários não publicados. A técnica imunohistoquímica utilizada foi através do método da peroxidase-antiperoxidase (PAP) utilizando anticorpos PGP 9.5; NSE; ACTH e calcitonina. O teste de Mc Nemar foi estatisticamente significativo com  $p \leq 0.05$ . O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para se estabelecer os níveis de concordância entre as variáveis ordinárias mais sensíveis. **Resultados:** as sensibilidades do PGP 9.5; NSE; ACTH e calcitonina foram 79,3%; 93,1%; 3,4%; e 6,8%, respectivamente. A análise com o teste de Mc Nemar não mostrou diferença entre as sensibilidades do PGP 9,5 e a NSE ( $p = 0,2888$ ). A distribuição foi significativa ( $p < 0,0001$ ) quando se comparou o PGP 9.5 com o ACTH e a calcitonina. O coeficiente de correlação de Spearman calculado para indicar o grau de associação entre PGP 9.5 e a enzima NSE foi  $-0,139$  ( $p = 0,4620$ ). **Conclusão:** o PGP 9.5 e a enolase neurônio específica são similares para a diferenciação, através da imunohistoquímica pelo método da peroxidase-antiperoxidase, do carcinoma de pequenas células extra-pulmonares.

**Descritores:** carcinoma de pequenas células, neoplasias pulmonares.

### ABSTRACT

**Introduction:** recent studies have confirmed the endocrine nature of small cell lung cancer and extra-pulmonary small cell carcinoma. The aim of this study was comparison of the usefulness of protein gene peptide 9.5 (PGP 9.5) with neuron-specific enolase (NSE), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and calcitonin to endocrine differentiation of extra-pulmonary small cell carcinoma by immunohistochemistry. **Material and methods:** analysis of not published primary date. Immunohistochemistry (peroxidase antiperoxidase) using antibodies to PGP 9.5, NSE, ACTH and calcitonin. Sensitivity of tumor markers. Mc Nemar test statistically significant with  $p$  less than or equal to 0.05. Spearman coefficient of correlation was used to establish levels of agreement among ordinal variables more sensitivities. **Results:** the sensitivity of PGP 9.5, NSE, ACTH and calcitonin were 79.3%, 93.1%, 3.4%, 6.8% respectively. The analysis with Mc Nemar test showed no difference between the sensitivity of PGP 9.5 and NSE ( $p = 0, 2888$ ). Comparison between PGP 9.5 with ACTH and calcitonin, the distribution was significant ( $p < 0, 0001$ ). Spearman rank correlations was  $-0, 139$  ( $p = 0, 4620$ ) for PGP 9.5 versus NSE. **Conclusion:** PGP 9.5 and neuron-specific enolase are similar to diagnostic endocrine differentiation by immunohistochemistry (peroxidase-antiperoxidase method) in small cell carcinoma extra-pulmonary.

**Key words:** carcinoma, small cell, lung neoplasms.

## Introdução

Do ponto de vista do estadiamento e do tratamento, os carcinomas brônquicos são classificados em dois grandes grupos: a) carcinoma não pequenas células (NSCLC), e b) carcinoma de pequenas células, com características neuroendócrinas (SCLC).<sup>1</sup> Isto porque esses dois grupos de neoplasias possuem diferentes comportamentos biológico e prognóstico, além de estarem associados a diferentes respostas terapêuticas.

Os carcinomas classificados como não pequenas células apresentam heterogeneidade fenotípica, e a cura e a sobrevida dos pacientes portadores dessa neoplasia estão diretamente associadas à sua ressecabilidade cirúrgica. Por esta razão, a subclassificação precisa do tipo celular é menos importante do que o diagnóstico diferencial entre carcinoma brônquico de pequenas células e carcinoma brônquico de não pequenas células.<sup>2</sup>

Qual a importância prática em se determinar tal fenótipo?

Estudos de Gazdar<sup>3</sup> e colaboradores e de Silva Junior e Cardoso<sup>4</sup> demonstraram que o fenótipo neuroendócrino associa-se a uma melhor resposta à quimioterapia e a uma melhora na sobrevida nos pacientes com carcinoma pulmonar de pequenas células. Demonstraram também que alguns dos carcinomas brônquicos são pequenas células, que apresentam diferenciação neuroendócrina, são mais agressivos e com disseminação mais precoce do que os que não apresentam tal diferenciação. Tais conclusões somente foram possíveis após o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

Os carcinomas de pequenas células também podem ocorrer em outros órgãos, com as mesmas características morfológicas daqueles que acometem os pulmões. Carcinomas de pequenas células já foram diagnosticados no esôfago, cólon, laringe, glândulas salivares, pâncreas, colo uterino, estômago, timo, próstata, bexiga, pele, seios paranasais, endométrio, mama e vesícula biliar.<sup>5</sup>

A enzima enolase neurônio específica (NSE), está sendo mais estudada como expressão do fenótipo neuroendócrino dos carcinomas brônquicos porque é o marcador tumoral mais sensível para caracterizá-lo. Além disso, ela é capaz de diferenciar os seus

mimetizadores mais freqüentes no diagnóstico histopatológico convencional que são o carcinoma da mama e os linfomas.<sup>6</sup>

O objetivo do estudo foi comparar PGP 9.5 (Protein Gene Peptide 9.5) com a enolase neurônio específica, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a calcitonina, por meio da imuno-histoquímica, para o diagnóstico de diferenciação endócrina do carcinoma de pequenas células extra-pulmonar.

## Material e métodos

Delineamento: estudo secundário correspondendo a revisão não sistemática, conduzida a partir do estudo primário publicado por Springall e colaboradores<sup>5</sup>.

Os dados primários de vinte e nove pacientes com carcinoma de pequenas células extra-pulmonares, caracterizados quanto ao seu sítio primário, subtipo histológico, imuno-histoquímica para NSE, PGP 9.5 e peptídeos específicos - ACTH e calcitonina foram selecionados.

A técnica imuno-histoquímica utilizada pelos pesquisadores foi aquela denominada por peroxidase-antiperoxidase (PAP), e a intensidade da imunoreatividade dos marcadores foi graduada, como dados nominais, em negativa (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++).

Análise estatística: os dados de todos os casos descritos por Springall e colaboradores<sup>5</sup>, foram transferidos para planilha eletrônica do *software Microsoft Excel*<sup>®</sup> 2000, com a finalidade de estudo estatístico analítico não publicado<sup>7</sup>.

O resultado do teste com a PGP 9.5 foi considerado o padrão áureo para comparação com os demais exames. Os resultados pareados foram analisados conservando os pares, a partir da colocação deles nas quatro células de uma tabela de contingência 2 x 2.

A significância estatística foi avaliada pelo teste de Mc Nemar<sup>8</sup>, uma modificação alternativa para o teste do Qui-quadrado para analisar amostras emparelhadas com  $n \geq 25$ . A sensibilidade de cada exame foi determinada com seus respectivos intervalos de confiança de 95 % estimado pela fórmula baseado no teorema binomial. A correlação entre o exame

<sup>1</sup>Professor Adjunto do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense. Disciplina de Pneumologia. TE SBPT.

<sup>2</sup>Professor Titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense. Doutor em Endocrinologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>3</sup>Pneumologista do S. de Tórax do Hospital do Câncer – INCA/MS. Mestre em Medicina pela Universidade Federal Fluminense. TE SBPT.

**Endereço para correspondência:** Cyro Teixeira da Silva Junior. Rua da Conceição 13/210, Centro - Niterói - RJ CEP 24020-080, E-mail: ctsilvajunior@predialnet.com.br

Artigo recebido para publicação no dia 15/03/2004 e aceito no dia 31/03/2004, após revisão.

mais sensível com o padrão áureo foi calculada através do coeficiente de Spearman ( $r_s$ ). Os testes estatísticos mencionados foram calculados utilizando-se o programa *MedCalc*.

## Resultados

Dos 29 casos de carcinoma de pequenas células extra-pulmonares descritos no estudo original de Springall e colaboradores<sup>5</sup>, 22 (75,8%) eram de esôfago, 2 (6,8%) de laringe, 2 (6,8%) de estômago e 2 de cólon (6,8%) e 1 (3,4%) de bexiga.

Os subtipos histológicos encontrados pelos autores incluíam: o tipo "oat cell" ou de pequenas células, misto entre pequenas células e células intermediárias e pequenas células combinadas com escamoso e/ou diferenciação endócrina.

Todos os subtipos histológicos encontrados no cólon e na laringe eram de pequenas células. Nos dois pacientes com o tumor no estômago, um era misto e o outro combinado. Nos 22 pacientes com o tumor no esôfago, 14 eram do subtipo misto (63,6%), 7 eram do subtipo pequenas células - "oat cell" (31,8%) e 1 paciente com subtipo combinado (4,5%).

Somente o caso com tumor combinado no esôfago possuía diferenciação escamosa, glandular e carcinóide.

A sensibilidade dos diversos marcadores para diferenciação endócrina nos casos de tumores de pequenas células extra-pulmonares, foram resumidos na tabela 1.

**Tabela 1** – Sensibilidades dos marcadores de diferenciação endócrina pesquisados pela técnica imuno-histoquímica de peroxidase-antiperoxidase nos 29 casos de carcinoma de pequenas células extra-pulmonares.

Marcador	Sensibilidade (%)	Intervalo de confiança 95%
Protein Gene Peptide 9.5	79,3	64,6 – 94,0
Enolase Neurônio Específica	93,1	83,8 – 102,2
ACTH *	3,4	-3,1 – 9,9
Calcitonina	6,8	-2,3 – 15,9

Fonte: Springall DR, et al. *J Pathol* 1986; 150: 151-162.

\* Hormônio Adrenocorticotrófico

**Tabela 2** – Significância estatística da comparação entre a técnica de PGP 9.5 com os demais marcadores para diferenciação endócrina nos 29 casos de carcinoma de pequenas células extra-pulmonares.

Marcadores comparados com PGP 9.5 *	$\chi^2$	Valor de p
NSE **	1,1250	0,2888
ACTH ***	20,0455	< 0,0001
CALCITONINA	18,0500	< 0,0001

Fonte: Springall DR, et al. *J Pathol* 1986; 150: 151-162.

\* Protein Gene Peptide 9.5

\*\* Enolase Neurônio Específica

\*\*\* Hormônio adrenocorticotrófico

A significância estatística avaliada pelo teste de Mc Nemar foi resumida na tabela 2.

O coeficiente de correlação de Spearman, calculado para indicar o grau de associação entre PGP 9.5 e a enzima NSE foi de -0,139 com valor de p igual a 0,4620 e intervalo de confiança a 95% de -0,481 e 0,240.

## Discussão

As técnicas de imuno-histoquímica detectam moléculas (antígenos) teciduais. É de grande valor nos diagnósticos anátomo-patológicos e na investigação científica<sup>9</sup>. O mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo primário associado a diversos tipos de processos de visualização.

O reconhecimento do antígeno por um anticorpo primário pode ser de uma maneira direta - o anticorpo primário é diretamente marcado, geralmente por substância fluorescente ou enzima, ou indireta - o anticorpo primário serve como antígeno para um segundo anticorpo (secundário) de outra espécie animal marcado<sup>9</sup>.

Atualmente estão disponíveis um grande número de anticorpos para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos de parafina, permitindo posterior estudo dos blocos arquivados por longos períodos<sup>9</sup>. Além de definição da histogênese de neoplasias morfológicamente indiferenciadas, imunofenotipagem de neoplasias já classificadas pela morfologia e identificação de produtos de síntese das células

neoplásicas, especialmente tumores endócrinos, outras indicações para a IHQ são a pesquisa de marcadores prognósticos, auxílio na diferenciação entre neoplasias e estados reacionais, e detecção de antígenos de agentes infecciosos<sup>9</sup>.

A sensibilidade da PGP 9.5 como marcador pan-neuro-endócrino na imunorreação foi de 79,3%. A sensibilidade da NSE como marcador de expressão de fenótipo neuro-endócrino na imunorreação foi de 93,1%. A sensibilidade do ACTH e da calcitonina como marcadores tumorais endócrinos presentes na imunorreação foi de 3,4% e 6,8%, respectivamente.

Quando NSE, ACTH e calcitonina foram comparados, pelo teste de Mc Nemar, com a PGP 9.5, somente ACTH e calcitonina obtiveram diferença, estatisticamente significativa para diagnóstico imuno-histoquímico do carcinoma de pequenas células extra-pulmonares. Ambos com sensibilidades muito pequenas em relação a PGP 9.5 e NSE.

Vários estudos da literatura mencionam que a sensibilidade de diagnóstico da NSE e da PGP 9.5, por imuno-histoquímica, dos carcinomas de pequenas células da bexiga, esôfago e outras localizações são semelhantes ao da localização pulmonar<sup>10,11</sup>.

Coifman e colaboradores<sup>12</sup>, em pesquisa realizada no Brasil, concluíram que a calcitonina plasmática não é um marcador tumoral útil no acompanhamento dos tumores de pulmão, porém somente 21,4% (12/56) dos pacientes pesquisados eram do tipo carcinoma indiferenciado de pequenas células.

Gross<sup>13</sup> também chegou à conclusão anterior, mas enfatizou que a associação de diversos marcadores séricos é importante para a identificação de pacientes com pior sobrevida.

A secreção de ACTH ectópico está associada, como manifestação paraneoplásica a tumores malignos, geralmente o carcinoma indiferenciado de pequenas células do pulmão ou os tumores carcinóides, e tem como manifestação clínica a síndrome de Cushing<sup>14</sup>.

Mori e colaboradores<sup>15</sup> estudaram dez casos de carcinoma de pequenas células do esôfago com imuno-histoquímica para ACTH e calcitonina. As sensibilidades encontradas foram 60% e 30%, respectivamente.

Baldi e colaboradores<sup>16</sup> concluíram que mesmo as neoplasias não pequenas células com marcadores neuroendócrinos positivos na imuno-histoquímica, devem ser considerados como carcinomas de células não pequenas com diferenciação neuroendócrina, mesmo que não tenham as características histológicas das neoplasias neuroendócrinas.

O coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) calculado para indicar o grau de associação entre PGP 9.5 e a enzima NSE foi de  $-0,139$  ( $p = 0,4620$ ; IC 95%:  $-0,481 - 0,240$ ). Sua magnitude varia entre  $-1$  (correlação perfeita negativa) e  $+1$  (correlação perfeita positiva), passando pelo valor 0 (ausência de correlação), sendo interpretada do mesmo modo que o coeficiente de correlação de Pearson<sup>8</sup>. O valor de  $r_s$  igual a  $-0,139$  conduz a interpretação da magnitude da força de associação como sendo negativa e pequena, com nível de significância, estatisticamente, não

significativo. Não foram encontrados na literatura consultada, dados para comparação.

A significância estatística da presente pesquisa foi demonstrada pelo ponto de corte do valor de  $p$ . Por outro lado, um resultado é significativo clinicamente, e importante, se o intervalo de confiança para o parâmetro de interesse difere do valor especificado na hipótese nula por uma quantidade considerada, clinicamente, relevante. Assim, o intervalo de confiança é um complemento do nível de significância.

Análise da tabela 1 concluiu que o marcador enolase neurônio específica, além de ser significativa, estatisticamente, é importante do ponto de vista da significância clínica para diagnóstico de diferenciação endócrina dos carcinomas de pequenas células extra-pulmonares.

As informações decorrente da presente pesquisa possuem relevância clínica e validade externa, sendo capaz de melhorar a vida dos pacientes, porque respondem de forma afirmativa às seguintes perguntas sugeridas por Slawson e Shaughnessy<sup>17</sup>: a) está a informação voltada para a solução de um problema específico? b) a intervenção proposta pelos resultados da investigação é factível? c) se a investigação é verdadeira, acarretará uma mudança significativa na prática clínica?

Segundo Wannmacher e Fuchs<sup>18</sup>, por relevância clínica, entende-se a avaliação de desfechos importantes para os pacientes derivados dos fatos em vez da "autoridade" ou de impressões da experiência clínica. Desfechos importantes decorrentes do presente trabalho são: complementação diagnóstica, durante o estadiamento, da diferenciação endócrina de um carcinoma de pequenas células extra-pulmonares, com extensão a qualquer carcinoma brônquico; avaliação em pesquisas, com delineamentos próprios e do impacto da diferenciação endócrina na sobrevida dos pacientes.

A utilidade de uma informação pode ser medida pela seguinte relação<sup>18</sup>: utilidade de informação = (relevância x validade)/trabalho.

Um editorial do Dr. Klaus L. Irion<sup>19</sup>, iniciou-se com a seguinte pergunta: "é preciso mudar o destino do paciente com carcinoma brônquico. Existe alguma alternativa além do diagnóstico precoce e de não fumar?". As conclusões do presente estudo respondem que sim.

Podemos concluir que o diagnóstico por imuno-histoquímica da diferenciação endócrina dos carcinomas de pequenas células extra-pulmonares é semelhante para PGP 9.5 e NSE, mas não para o ACTH e a calcitonina. A diferenciação endócrina dos carcinomas de pequenas

células extra-pulmonares é semelhante aos carcinomas pulmonares de pequenas células.

### Comentários

Existem três maneiras gerais para o uso de dados existentes: análise de dados secundários, estudos suplementares e revisões sistemáticas. O uso criativo de dados primários é uma forma eficaz para pesquisadores, com tempo e recursos financeiros limitados, começarem a responder questões de pesquisa importantes de forma rápida e eficiente.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zamboni M. Câncer do Pulmão. In: Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado Rio de Janeiro. Pneumologia: Aspectos práticos e atuais. 1a. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 313-19.
2. Ulbrich-Kulczynski JM. Estudo imuno-histoquímico de 473 casos de carcinomas não de pequenas células do pulmão. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
3. Gazdar AF, Kadoyama C, Venzon D. The association between histologic type and neuroendocrine differentiation on drug sensitivity of lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1992;13:191-6.
4. Silva Junior CT, Cardoso GP. Endocrine expression in bronchogenic carcinoma. *Rev Port Pneumol* 2003;IX(2):109-15.
5. Springall DR, Ibrahim NBN, Rode J. Endocrine differentiation of extra-pulmonary small cell carcinoma demonstrated by immunohistochemistry using antibodies to PGP 9.5, neuron-specific enolase and the c-flanking peptide of human pro-bombesin. *J Pathol* 1986;150:151-62.
6. Banner BF, Warren WH, Gould VE. Cytomorphology and marker expression of malignant neuroendocrine cells in pleural effusions. *Acta Cytol* 1986;30(2):99-104.
7. Levine DM, Berenson ML, Stephan D. Statistics for Managers Using Microsoft<sup>®</sup> Excel (Updated Version). 1a. ed. New York: Prentice Hall Inc; 1998.
8. Doria Filho U. Introdução à bioestatística. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003.
9. Reis MM. Técnicas imuno-histoquímicas. In: Reis MM, editor. Testes imunológicos. 1a. ed. Porto Alegre: AGE; 1998. p. 52-4.
10. Chuang CK, Liao SK. A retrospective immunohistochemical and clinicopathological study of small cell carcinomas of the urinary tract. *Chang Gung Med J* 2003;26(1):26-33.
11. Ermisch B, Schwechheimer K. Protein gene product (PGP) 9.5 in diagnostic (neuro-) oncology. An immunomorphological study. *Clin Neuropathol* 1995;14(3):130-6.
12. Coifman R, Weforte RV, Kasamatsu TS, Fukushima L, Santoro I, Jamnik S, Vieira JG, Castro ML. Monomeric plasmatic calcitonin and hypercalcemia in lung cancer patients. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43(2):105-8.
13. Gross JL. Marcadores tumorais séricos em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
14. Terzolo M, Reimondo G, Ali A, Bovio S, Daffara F, Paccotti P, Angeli A. Ectopic ACTH syndrome: molecular bases and clinical heterogeneity. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 2:S83-7.
15. Mori M, Matsukuma A, Adachi Y, Miyagahara T, Matsuda H, Kuwano H, Sugimachi K, Enjoji M. Small cell carcinoma of the esophagus. *Câncer* 1989;63(3):564-73.
16. Baldi A, Groger AM, Esposito V, Di Marino MP, Ferrara N, Baldi F. Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung carcinomas. *In Vivo* 2000; 14(1):109-14.
17. Slawson DC, Shaughnessy AF. Obtaining useful information from expert based sources. *BMJ* 1997;314 947-49.
18. Wannmacher L, Fuchs FD. Conduta terapêutica embasada em evidências. *Rev Assoc Med Bras* 2000;46(3):237-41.
19. Irion KL. Diagnóstico precoce do câncer de pulmão. *Radiol Bras* 2002;35(3):III-IV. ■