

Diferenciação neuroendócrina dos mesoteliomas pleurais

Neuroendocrine differentiation in pleural mesotheliomas

Cyro Teixeira da Silva Junior¹, Gilberto Perez Cardoso²,
Letícia Maciel dos Santos³, Rodolfo Fred Behrsin⁴,
Elizabeth Giestal de Araujo⁵

Pulmão RJ 2005; 14(1): 28-32

RESUMO

Introdução: o termo neuroendócrino tem sido usado para definir células que secretam seus produtos de maneira regulada ou dirigida em resposta a estímulos específicos. O sistema neuroendócrino inclui neurônios, células endócrinas e células imunes, compartilhando um fenótipo comum, caracterizado pela expressão de diversos marcadores. O objetivo do presente estudo foi determinar por imunohistoquímica, o grau de diferenciação neuroendócrina em mesoteliomas pleurais por meio da sensibilidade múltipla em paralelo dos marcadores tumorais cromogranina A e enolase neurônio-específica (NSE). **Metodologia:** estudo secundário resultante da revisão não sistemática. Análise de dados primários não publicados de 16 pacientes com mesotelioma pleural maligno. A técnica imuno-histoquímica utilizada foi peroxidase-anti-peroxidase. Os marcadores utilizados foram: cromogranina A; NSE; queratina, vimentina, desmina, actina muscular e proteína S100. Cálculo da sensibilidade isolada de cada marcador e da sensibilidade para diferenciação neuroendócrina com os marcadores NSE e cromogranina A na combinação múltipla em paralelo. **Resultados:** pacientes eram 11 homens (média de idade, 63 anos) e 5 mulheres (média de idade, 47 anos). Dos casos, 81% (13/16) eram do tipo histológico epitelial e 19% (3/16) do tipo bifásico. Sensibilidade isolada dos marcadores: queratina 100%, vimentina 94%, desmina 56%, NSE 25%, cromogranina A 31%, proteína S100 31% e actina muscular 0%. Sensibilidade para diferenciação neuroendócrina de 55,9% com NSE e cromogranina A usados como testes múltiplos em paralelo. **Conclusão:** na prática clínica a expressão de marcadores neuroendócrinos em mesoteliomas pleurais conduz a possibilidade dessas neoplasias expressarem maior quimiossensibilidade e de serem úteis para o diagnóstico diferencial com outros tipos de neoplasias na pleura.

Descritores: diferenciação neuroendócrina, marcadores tumorais, mesotelioma pleural, cromogranina A, enolase neurônio-específica.

ABSTRACT

Introduction: the term neuroendocrine has been used to define cells that secrete their products (markers) in a regulated manner, in response to a specific stimulus. The neuroendocrine system includes neurons, endocrine cells and immune cells. The presence of a neuroendocrine marker was viewed as evidence of the neuroendocrine origin of the tumor cells. Our purpose was to determine the sensitivity of neuroendocrine differentiation using neuron specific enolase (NSE) and chromogranin A in a parallel multiple test in pleural mesotheliomas. **Methodology:** analysis of unpublished primary data. The distribution of keratin, vimentin, desmin, muscular actin, S100 protein, NSE, and chromogranin A was studied by immunohistochemistry according to peroxidase antiperoxidase (PAP) method. Sensitivity of tumor markers was used in a parallel combination strategy from 16 specimens with diffuse mesotheliomas of the pleura (epithelial and biphasic type). **Results:** patients included 11 men (mean age, 63 years old) and five women (mean age, 47 years old). Thirteen cases (81%) were of epithelial type and three cases (19%) of biphasic type. Sensitivity of each tumor marker used was keratin 100%, vimentin 94%, desmin 56%, cromogranin A 31%, NSE 25%, proteína S100 31% and muscular actin 0%. Sensitivity of neuroendocrine differentiation with tumor markers used in a parallel multiple tests was 55.9%. **Conclusion:** in the practical clinic the expression of pleural neuroendocrine markers in mesotheliomas leads the possibility of these neoplasms to express greater chemosensitivity and to be useful for the distinguishing diagnosis with other types of neoplasms in the pleura.

Keywords: neuroendocrine differentiation, tumor markers, pleural mesothelioma, neuron specific enolase, chromogranin A.

Introdução

O termo neuroendócrino tem sido usado para definir células que secretam seus produtos de maneira regulada ou dirigida em resposta a estímulos específicos. O sistema neuroendócrino inclui neurônios e células endócrinas, compartilhando um programa fenotípico comum, caracterizado pela expressão de diversos marcadores¹.

Alguns exemplos de marcadores neuroendócrinos mencionados pela literatura são: L-aminoácido descarboxilase (AADC), acetilcolinesterase (AChE), *protein gene product* (PGP) 9.5, cromograninas A, B e C (secretogranina II), enolase neurônio-específica (NSE), hormônios peptídeos, sinaptofisina, moléculas de adesão da célula neural (NCAM), entre outros².

Características neuroendócrinas têm sido usadas como evidência de uma origem embrionária comum para células normais e neoplásicas. Entretanto, atualmente, é reconhecido que características neuroendócrinas podem ser observadas em vários tipos celulares, tais como os imunócitos, que não tem a mesma origem embrionária de neurônios ou células endócrinas¹.

Day e Salzet¹ propõem redefinir o conceito neuroendócrino para incluir a noção de ativação ou transferência genética específica que conduz a expressão do fenótipo neuroendócrino, total ou parcialmente, em uma variedade de tipos celulares, incluindo as células do sistema imune. As considerações mencionadas conduzem ao termo “sistema neuroimunoendócrino”, cuja ação e interação está sendo objeto de estudo e pesquisa dos autores deste trabalho.

A importância de se estudar o fenótipo neuroendócrino nos tumores brônquicos já foi demonstrada por vários estudos na literatura. Trabalho clássico de Gazdar e colaboradores³ concluiu que tumores brônquicos não pequenas células (NSCLC) que expressam marcadores neuroendócrinos são quimiossensíveis, assim como tumores brônquicos de pequenas células (SCLC). Estudos semelhantes com mesoteliomas pleurais não foram encontrados na literatura.

O mesotelioma pleural é uma forma rara no Brasil de tumor maligno primário de pleura. A relação entre a inalação de fibras de amianto e o risco de mesotelioma pleural já está bem definida, assim como a associação desse tipo de fibras com mesotelioma de peritônio, pericárdio e túnica vaginal. Pode também estar relacionado com outros tipos de câncer como o de laringe⁴.

De acordo com Dail e colaboradores⁵, a classificação histológica dos mesoteliomas pleurais é a seguinte: epitelial (subtipos tubulopapilar, epitelioide, glandular, células gigantes, pequenas células, cisto-adenóide e anel de sinete), sarcomatóide (fibroso, sarcomatoso, mesenquimal), bifásico (epitelial e sarcomatóide), transicional, desmoplástico e tumor fibroso localizado da pleura. Na opinião destes autores⁵, mesoteliomas classificados como benignos são na realidade hiperplasia. O tipo mesotelioma pleural difuso seria melhor classificado como transicional. O termo “mesotelioma fibroso localizado” deve ser denominado de tumor fibroso localizado da pleura e não é de origem mesotelial.

O objetivo do presente estudo foi determinar o grau de diferenciação neuroendócrina em mesoteliomas pleurais por meio da sensibilidade múltipla dos marcadores cromogranina A e enolase neurônio-específica usados como testes em paralelo, por imuno-histoquímica, em tecidos fixados de mesoteliomas pleurais.

Metodologia

Delineamento: estudo secundário correspondendo a revisão não sistemática, conduzida a partir do estudo primário publicado por Hurlimann⁶.

Novos exames para diagnóstico de mesotelioma pleural maligno não foram realizados a partir da casuística Hurlimann porque o delineamento é um estudo secundário. Somente delineamento com estudos suplementares acrescentam medições de um número pequeno de variáveis, para responder a uma nova hipótese de pesquisa⁷.

1. Professor Adjunto de Pneumologia da Universidade Federal Fluminense. Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural da Disciplina de Pneumologia do Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

2. Professor Titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense.

3. Aluna do Programa de Iniciação Científica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

4. Mestre em Pneumologia pela Universidade Federal Fluminense.

5. Professora Adjunta do Departamento de Neurobiologia e do Programa de Neuroimunologia da Universidade Federal Fluminense.

Trabalho realizado em conjunto pelos Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas e Neuroimunologia da Universidade Federal Fluminense, Cidade de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

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

Artigo recebido para publicação no dia 19/02/2005 e aceito no dia 23/03/2005, após revisão.

Aspectos éticos e consentimento dos autores dos dados primários não foram considerados porque, segundo Hulley e colaboradores⁷, “os estudos de registros, dados ou espécimes já existentes, são tipos de pesquisa isentos de revisão pelo Comitê de Ética em Pesquisa, desde que existam amostras disponíveis ao público”.

Os dados primários de 16 pacientes com mesotelioma pleural maligno foram estudados. Os tumores foram classificados histologicamente em peças fixadas em formol. A imuno-histoquímica foi realizada em lâminas fixadas e embebidas em parafina para os marcadores cromogranina A, enolase neurônio-específica, vimentina, queratina, desmina, proteína S100 e actina muscular.

A classificação histológica das diversas amostras estudadas por Hurlimann⁷ estava de acordo com a classificação proposta por Dail e colaboradores⁵.

A técnica imuno-histoquímica utilizada pelos pesquisadores foi aquela denominada de peroxidase-anti-peroxidase (PAP) por Sternberger e colaboradores⁸. Esta técnica usa diaminobenzidina como cromógeno. A intensidade da imunorreatividade dos marcadores foi graduada, como dados nominais, em negativa (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++).

Análise estatística

Os dados de todos os casos descritos por Hurlimann⁶ foram transferidos para a planilha eletrônica do software Microsoft Excel[®]2000, com a finalidade de estudo estatístico descritivo. As sensibilidades isoladas de cada exame foram calculadas com seus respectivos intervalos de confiança de 95%^{9,10}.

A análise estatística utilizada, e não publicada por Hurlimann⁶, foi a sensibilidade isolada de cada marcador tumoral testado. Para elevar a qualidade e otimizar o desempenho do diagnóstico de diferenciação neuroendócrina para mesotelioma pleural, foi calculada a sensibilidade total dos marcadores neuroendócrinos testados (NSE e cromogranina A) como teste múltiplo paralelo, utilizando a seguinte fórmula: $Tp+ = A+ \cup B+$. Usando linguagem de probabilidade de eventos, $Tp+$ é teste múltiplo em paralelo positivo, $A+$ representa o resultado positivo do teste A e $B+$ o resultado positivo do teste B. Denota-se por $A \cup B$, o evento união do teste A e do teste B. A sensibilidade combinada dos testes em paralelo foi calculada com auxílio de regras de cálculo de probabilidade para a união de dois eventos independentes⁹.

Resultados

A descrição dos casos e as sensibilidades isoladas dos diversos exames nos 16 casos confirmados de mesotelioma pleural descritos no estudo original de Hurlimann⁶ estão resumidas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Descrição dos 16 pacientes diagnosticados como mesotelioma pleural.

Parâmetros	Resultados
Média de idade (limites) anos	57,9 (20 – 78)
Sexo masc. / média idade	11 pacientes (69,0%)/63 anos
Sexo fem. / média idade	5 pacientes (31,0%)/47 anos
Tipo histológico epitelial	13/16 (81,0%)
Tipo histológico bifásico	3/16 (19,0%)

Fonte: Hurlimann, 1994.

Tabela 2 – Sensibilidades isoladas dos marcadores. Imuno-histoquímica em 16 casos de mesotelioma pleural nos tipos histológicos epitelial e bifásico.

Marcadore	Sensibilidades isoladas (intervalo de confiança de 95%)
Queratina	100,0 (83,8 – 100,0)
Vimentina	94,0 (74,8 – 99,6)
Desmina	56,0 (33,3 – 77,4)
Enolase Neurônio-Específica	25,0 (8,9 – 47,9)
Cromogranina	31,0 (13,1 – 77,4)
Proteína S 100	31,0 (13,1 – 77,4)
Actina Muscular	0,0 (0 - 0)

Fonte: Hurlimann, 1994.

A sensibilidade múltipla paralela dos marcadores para diferenciação neuroendócrina testados nos 16 casos de mesotelioma pleural foi de 55,9% (IC95% 39,4% – 72,1%). O resultado obtido foi o cálculo das sensibilidades totais (múltiplas em paralelo) decorrentes dos resultados das sensibilidades isoladas, considerando os marcadores NSE e cromogranina A.

Discussão

As técnicas de imuno-histoquímica detectam moléculas (antígenos) teciduais. É de grande valor nos diagnósticos anátomo-patológicos e na investigação científica. O mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo primário associado a diversos tipos de processos de visualização¹¹.

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 períodos¹¹.

A detecção imuno-histoquímica de painéis de antígenos para diferentes tipos de tumores tem aumentado a precisão do diagnóstico histopatológico e, muitas vezes, tem permitido análise do prognóstico de diversos tipos de neoplasia^{12,13}.

A técnica de peroxidase anti-peroxidase (PAP) é uma variação da técnica de imunoperoxidase e é ainda o método de escolha para detecção de antígenos em tecidos ou preparações bacterianas com níveis altos de biotina endógena como rim, fígado e cortes por congelamento, além de ser utilizada em patologias cirúrgicas para detectar enzimas e antígenos tumorais¹¹.

A análise da tabela 1 concluiu que 81% (13/16) dos casos estudados de mesoteliomas pleurais eram do tipo histológico epitelial e 19% (3/16) do tipo bifásico. Estatística de Hammar e Bolen (1988) em 241 mesoteliomas malignos, *apud* Deil e colaboradores⁵, menciona uma frequência de 52% para o tipo epitelial e 17% para o tipo bifásico.

No estudo de Hurlimann⁶, observa-se a alta sensibilidade para o diagnóstico de neoplasias epiteliais com dos marcadores queratina (100%) e vimentina (94%); a baixa sensibilidade para os marcadores de neoplasias musculares representados no estudo pela desmina (56%) e actina muscular, em conjunto com a proteína S100, um marcador típico do sistema nervoso central (marcador de astrócitos).

No estudo original de Hurlimann⁶ foi concluído que: “a desmina, encontrada em 56% dos mesoteliomas malignos mas ausente nos carcinomas pulmonares, pode ser útil no diagnóstico diferencial desses tumores”. Entretanto, estes marcadores não caracterizam diferenciação neuroendócrina celular.

No estudo de Hurlimann⁶, nos 16 casos de mesoteliomas pleurais, o cálculo das sensibilidades isoladas dos marcadores neuroendócrinas estudados cromogranina A e NSE foram 31% e 25%, respectivamente. A sensibilidade múltipla paralela que definiu a diferenciação neuroendócrina pelos marcadores estudados foi de 55,9%.

No estudo de Mayall e Gibbs¹⁴ encontrado para comparação, em 13 mesoteliomas pleurais estudados do tipo histológico epitelial, subtipo pequenas células, a sensibilidade da NSE foi de 85%. Nenhum foi positivo para cromogranina A.

O estudo de Johansson e Liden¹⁵ conclui que a imuno-histoquímica é importante para estabelecer o diagnóstico de mesotelioma pleural, além de ser um esforço a mais para classificar corretamente o subtipo histopatológico. Não avaliaram marcadores neuroendócrinos nos 85 casos estudados.

Concluiu-se que a sensibilidade para diferenciação neuroendócrina dos mesoteliomas pleurais estudados foi de 55,9% com os marcadores cromogranina A e enolase neurônio específica usados como testes múltiplos em paralelo. A implicação clínica desses achados seria a possibilidade desses mesoteliomas

expressarem maior quimiossensibilidade e/ou a possibilidade desses marcadores serem úteis no diagnóstico diferencial com outros tipos de neoplasias. A análise imuno-histoquímica deve ser confrontada com a informação clínica e a análise morfológica usual antes que o diagnóstico de mesotelioma maligno seja feito.

Comentários: Existem três maneiras gerais para utilização de dados primários: análise de dados secundários, estudos suplementares e revisões sistemáticas. O uso criativo de dados existentes 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. Day R, Salzet M. The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23(5-6):447-51.
2. Langley K. The neuroendocrine concept today. *Ann N Y Acad Sci* 1994;733:1-17.
3. Gazdar AF, Kadoyama C, Venzon D, Park JG, Tsai CM, Linnoila RI, Mulshine JL, Ihde DC, Giaccone. Association between histological type and neuroendocrine differentiation on drug sensitivity of lung cancer cells lines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992;13:191-6.
4. Instituto Nacional do Cancer. Mesotelioma. [Cited Jan 2005]. Available from: URL: <http://www.inca.gov.br>
5. Dail DH, Hammar SP, Colby TV. Pulmonary pathology tumors. 2nd ed. New York (NY): Springer-Verlag; 1995.
6. Hurlimann J. Desmin and neural marker expression in mesothelial cells and mesotheliomas. *Human Pathol* 1994;25:753-7.
7. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. Designing clinical research: an epidemiologic approach. Baltimore (USA): 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
8. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18(5):315-33.
9. Soares JF, Siqueira AL. Introdução à estatística médica. 2a ed. Belo Horizonte (MG): Coopmed; 2002.

10. Vieira S. Bioestatística. Tópicos avançados. 2a ed. Rio de Janeiro: Campus; 2003.
 11. Reis MM. Técnicas imuno-histoquímicas. In: Reis MM, editor. Testes Imunológicos. 1a ed. Porto Alegre: AGE; 1998. p.52-4.
 12. Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. Semin Diagn Pathol 2000;17:170-7.
 13. Alves VAF, Leandro LO, Vassallo J, et al. Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoceratinas e receptor de estrógeno como modelos. J Bras Patol Med Lab 2004;40(3):175-83.
 14. Mayall FG, Gibbs AR. The histology and immunohistochemistry of small cell mesothelioma. Histopathology 1992;20(1):47-51.
 15. Johansson L, Linden CJ. Aspects of histopathologic subtype as a prognostic factor in 85 pleural mesotheliomas. Chest 1996;109(1):109-14. ■
-