

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

***Densidade microvascular e prognóstico de tumores neuro-
endócrinos gastro-entero-pancreáticos***

Carlos Alberto Sousa Soares

Porto 2010

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE
MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Orientador: Prof. Doutor António Taveira Gomes

Co-orientador: Prof. Doutor José Manuel P. B. Lopes

Índice

Agradecimentos	7
Introdução	9
1.1. Tumores Neuro-Endócrinos Gastro-Entero-Pancreáticos	10
1.2. Angiogénese	12
1.3. Marcadores de Angiogénese	14
Objectivos	16
Material e Métodos	18
3.1 - Selecção e caracterização de casos	19
3.2 - Avaliação Patológica	19
3.3 - Anticorpos	20
3.4 - Imuno-histoquímica	20
3.5 - Quantificação	21
3.6 - Análise estatística	21
Resultados	23
4.1 – Casuística	24
4.2 – Características clínico-patológicas	24
4.2.1 - CD 105	28
4.2.2 - CD 31	32
4.2.3 - Ki-67	37
4.2.4 - Tumores endócrinos do pâncreas	39
4.2.5 - Tumores neuro-endócrinos do intestino médio (excepto apêndice ileocecal)	39
4.2.6 - Tumores neuro-endócrinos do apêndice ileocecal	40
4.2.7 - Reprodutibilidade da avaliação quantitativa dos resultados imuno-histoquímicos	41
Discussão	43
Conclusões	48

Resumo (Portugûes)	50
Resumo (Inglês)	53
Bibliografia	56

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor António Taveira Gomes, orientador desta tese, pela disponibilidade pessoal e pelo exemplo de rigor científico revelado ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Doutor José Manuel Lopes, co-orientador desta tese, pelo empenho, pela disponibilidade, pelos valiosos conselhos e enorme contributo científico.

Ao Mestre John Preto, pela sua colaboração neste trabalho, pela estimulação, e acima de tudo, pela amizade.

Ao Dr. Herberto Bettencourt, pelo seu esforço e dedicação na obtenção dos resultados.

Ao Prof. Doutor Pinto de Sousa pela amizade e inestimável contributo na análise estatística.

À Prof^a. Doutora Cristina Santos pelo contributo no desenho do estudo e na análise estatística.

Ao Dr. J. Costa Maia, meu Director do Serviço, por todo o esforço para garantir o máximo de qualidade ao Internato de Cirurgia Geral.

Ao Prof. Doutor Amadeu Pimenta, meu ex-Director de Serviço, pelas oportunidades proporcionadas e pelo seu inestimável contributo no Ensino da Cirurgia; deixo aqui a minha sentida homenagem à sua memória.

Ao Prof. Doutor Cardoso de Oliveira, meu ex-Director de Serviço, pelo constante incentivo à investigação básica e clínica.

Ao Prof. Doutor Manuel Sobrinho Simões, coordenador do Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular, pelo seu papel determinante na investigação.

Ao Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto e, em especial, à Prof. Doutora Paula Soares, pela simpatia e disponibilidade na preparação do material anátomo-patológico.

À Prof. Doutora Fátima Carneiro por todo o apoio à realização deste trabalho, nomeadamente na disponibilização do material anátomo-patológico.

À Mestre Elisabete Barbosa, minha orientadora de Internato, pela amizade e pelo constante estímulo para uma maior exigência científica.

Aos meus colegas do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital de São João pelo constante apoio e ombro amigo.

À minha Família,

À Sara e à Sofia, pela compreensão...

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Tumores Neuro-Endócrinos Gastro-Entero-Pancreáticos

Os tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreáticos (GEP-NETs) são compostos por células neuroendócrinas com capacidade de produzir, armazenar, e segregar substâncias biologicamente activas e de causar síndromes clínicas distintos¹.

Os GEP-NETs constituem aproximadamente 2 % das neoplasias do sistema gastro-intestinal². A raridade dos GEP-NETs dificulta o seu diagnóstico e o estabelecimento de estratégias terapêuticas adequadas. A incidência anual dos GEP-NETs está estimada em 1,2 a 3 casos por 100,000 habitantes, registando-se nas últimas décadas um ligeiro aumento^{1,3}. No entanto, esta estimativa não é segura devido às diferenças na qualidade dos registos e na metodologia utilizada nas últimas décadas no diagnóstico de GEP-NETs. Apesar de alguns avanços no conhecimento biológico destes tumores, as taxas de sobrevivência têm-se mantido estáveis nas últimas 5 décadas³.

Classicamente, os tumores neuroendócrinos do tubo digestivo eram designados como *carcinóides*, com excepção dos tumores neuroendócrinos do pâncreas, independentemente da sua topografia, produção hormonal ou agressividade biológica. A inclusão no mesmo grupo de tumores com comportamentos biológicos diferentes tornou evidente a limitação desta designação, especialmente na aplicação eficiente de esquemas de tratamento adequados¹. Em 2000 e 2004 (tumores endócrinos do pâncreas), a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação mais compreensiva, baseada na diferenciação tumoral e nas características clínico-patológicas específicas da localização anatómica dos GEP-NETs. A designação carcinoma neuroendócrino é introduzida para os tumores clinicamente malignos. No entanto, esta classificação da OMS, revelou deficiências na avaliação prognóstica dos doentes com GEP-NETs. Mais recentemente, a European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS), publicou propostas de estadiamento (TNM) para os GEP-NETs^{4,5}. Este sistema de classificação poderá permitir uma melhor avaliação do prognóstico e consequentemente dos esquemas de tratamento destes tumores. No entanto, ainda está dependente de estudos clínico-patológicos adequados de validação.

Os GEP-NETs partilham pelo menos quatro características comuns: 1) secreção de uma variedade de substâncias que podem ser usadas como

marcadores tumorais⁶; 2) associação com síndromes hereditárias¹; 3) abundância em vasos estromais, que podem ser alvo de terapêuticas inibidoras da angiogénese⁷; 4) expressão de receptores de peptídeos, como por exemplo da somatostatina, com importância na avaliação imagiológica, da função, na identificação de alvos terapêuticos anti-proliferativos, e na síndrome carcinóide^{1,8,9,10}.

Alguns dos mecanismos genéticos de regulação celular envolvidos na iniciação e progressão dos GEP-NETs já foram identificados: factores de transcrição; via da p53; regulação da reparação e replicação do DNA; vias de sinalização de receptores com afinidade cinásica da tirosina (RTK) e via do factor induzido pela hipoxia (HIF) - como resposta à hipóxia e angiogénese^{11,12,13}.

A única forma de tratamento potencialmente curativa, continua a ser a cirurgia com remoção completa dos tumores localizados e loco-regionais^{1,6}. A estratégia cirúrgica depende da localização do tumor primário. Os doentes que apresentam doença metastática, frequentemente hepática, representam um desafio para o cirurgião. A selecção adequada de doentes candidatos a metastasectomia tem-se associado a melhoria da sobrevida dos doentes com GEP-NETs^{6,14}. Outras questões, relacionadas com a cirurgia, continuam por definir: 1) papel da citoredução nos tumores irresssecáveis¹⁴; 2) indicação para linfadenectomia; e 3) extensão da ressecção de alguns tumores, por exemplo nos NETs do apêndice. A identificação de novos factores de prognóstico poderá ajudar a clarificar algumas destas questões.

A expressão de receptores de somatostatina tem sido uma área de interesse nos GEP-NETs, devido à sua aplicação na imagiologia e na terapêutica destes tumores^{8,9,10}. Outras formas de tratamento médico incluem a terapêutica biológica com interferão alfa e a quimioterapia⁶. A natureza altamente vascular dos TNEs motivou um interesse na inibição angiogénica como opção terapêutica⁶. Vários ensaios clínicos estão a decorrer com inibidores da angiogénese mas os resultados têm sido desencorajadores. Estudos multicêntricos recentes com a rhEndostatina, o sunitinib e o bevacizumab revelaram resposta clínica (regressão tumoral - respostas radiológicas parciais ou completas) ou bioquímica (Cromogranina A) pouco significativas em pacientes com tumores neuroendócrinos avançados^{6,15,16,17}. Muitos investigadores têm sugerido que os

inibidores da angiogénese são citostáticos e não citotóxicos. O facto de uma grande percentagem de tumores neuroendócrinos apresentar uma evolução lenta torna difícil a interpretação destes resultados.

Recentemente, Comoglio *et al* identificaram uma via molecular através da qual a hipoxia promove o crescimento tumoral induzindo a activação transcricional do proto-oncogene met. Este estudo fornece evidência de um segundo tipo de resposta celular à hipoxia, complementar e independente da resposta angiogénica mediada pelo VEGF. Estes resultados levantam a possibilidade da terapêutica anti-angiogénica, ao reduzir a vascularização tumoral na neoplasia primária, promover a disseminação de células para locais mais oxigenados: metastização.

1.2. Angiogénese

"tumor growth is angiogenesis dependent"

Folkman

A angiogénese providencia o fornecimento de oxigénio e nutrientes adaptados às alterações metabólicas dos tecidos. A angiogénese disfuncional está na origem de muitas entidades nosológicas¹⁸.

A angiogénese pode resultar de alterações genéticas ou ser induzida por alterações locais, nomeadamente hipoxia, défices de glucose ou *stress* mecânico e/ou oxidativo. Múltiplas alterações genéticas estão relacionadas com perturbações da angiogénese: o *RAS*, *MYC*, *RAF*, *HER-2/neu*, *c-JUN* e *SRC* aumentam a expressão do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e/ou diminuem a expressão de trombospondina-1 (TSP-1)^{19,20,21,21}.

A angiogénese neoplásica é diferente da angiogénese fisiológica: os neovasos neoplásicos são irregulares, tortuosos, hiperpermeáveis e apresentam *shunts* arterio-venosos anómalos. Estas alterações causam fluxo sanguíneo irregular, permeabilidade vascular aumentada e pressão elevada no espaço intersticial intra-tumoral. Estas modificações facilitam a entrada de células neoplásicas em circulação e a metastização^{23,24,25} e dificultam a acção de alguns fármacos anti-tumorais.

As células endoteliais das neoplasias expressam com elevada frequência algumas moléculas de superfície, nomeadamente integrinas, E-selectina, endoglina, endosialina e receptores do VEGF que podem ser alvo de terapêuticas biológicas dirigidas²⁶.

"onset of angiogenesis also contributes to metastasis... decreased angiogenesis is associated with a decreased rate of metastasis".

Folkman

Há evidência pré-clínica e clínica do papel importante da angiogénese no desenvolvimento tumoral e na progressão neoplásica²⁷. Folkman demonstrou a importância da angiogénese na progressão neoplásica: "para um tumor crescer mais do que 1-2mm necessita de vasos sanguíneos para o fornecimento de nutrientes e oxigénio²⁸. Estudos recentes têm demonstrado uma correlação entre o grau de angiogénese tumoral e o prognóstico (mama; prostata; cólon; pulmão e cérebro) tendo a angiogénese sido proposta como um marcador prognóstico promissor em neoplasias de vários órgãos^{29,30}. Poucos estudos têm avaliado a implicação clínica da angiogénese tumoral nos tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreáticos (GEP-NETs), sendo os resultados controversos.

A inibição da angiogénese associa-se a diminuição do crescimento e da metastização tumoral em muitos modelos pré-clínicos. Há ensaios clínicos de fármacos anti-angiogénicos em carcinomas metastizados com resultados interessantes³¹.

Investigações recentes sugerem que a terapêutica anti-angiogénica pode, além de inibir a angiogénese, modelar a estrutura e função dos neovasos, aumentando a acessibilidade de fármacos e normalizando o micro-ambiente tumoral³². Contrariamente às células endoteliais de tecidos normais, que em condições fisiológicas são quiescentes - excepto durante períodos de inflamação, ovulação, gravidez, cicatrização de feridas e de isquemia -, as células endoteliais nas neoplasias em progressão apresentam índice mitótico até 50 vezes superior e maior sensibilidade à terapêutica anti-angiogénica. Por outro lado, as células endoteliais neoplásicas parecem ser geneticamente estáveis e desenvolvem menos resistência à terapêutica^{25,33}. Quando indicada, alguns autores sugerem a importância da terapêutica anti-angiogénica precoce de modo a inibir as fases iniciais do

crescimento neoplásico ou a diminuir o crescimento de neoplasias mais avançadas, sendo a eficácia inversamente proporcional ao volume tumoral.

1.3. Marcadores de Angiogénese

Um dos métodos de avaliação da angiogénese consiste na determinação da densidade vascular. A principal limitação na avaliação da angiogénese através da determinação da densidade vascular decorre do tipo de marcador utilizado. De facto, não existe consenso na literatura relativamente ao anticorpo mais adequado. Múltiplos estudos têm utilizado marcadores pan-endoteliais, nomeadamente CD34, CD31 e factor de von Willebrand, na avaliação da densidade de microvasos. A avaliação da densidade de microvasos com estes marcadores pode não ser a mais correcta porque eles também são expressos em vasos normais^{34,35}.

A glicoproteína transmembranar CD31 (molécula de adesão celular plaqueta-endotélio) é um marcador pan-endotelial sensível em tecidos tumorais e normais. Também pode ser expressa em células plasmocitárias e inflamatórias^{36,37}. No entanto, a expressão de CD 31 pode não ser detectada em neovasos intra-tumorais, como descrito por Giatromanolaki et al³⁷.

Vários estudos têm evidenciado que nenhum dos marcadores vasculares, nomeadamente o factor de von Willebrand, o CD 31 ou o CD 34, é ideal para a avaliação da angiogénese neoplásica porque não permitem identificar neovasos nem são específicos de células endoteliais^{35,38}.

O anticorpo monoclonal CD 105 (endoglina), identifica o receptor do factor transformador do crescimento β 1 (TGF- β 1). Este receptor é uma glicoproteína transmembranar do tipo I que é expressa nas células endoteliais na angiogénese tumoral e nos processos inflamatórios, sendo pouco expressa no endotélio de tecidos normais³⁹. Múltiplos estudos têm demonstrado que a endoglina é um marcador mais específico e sensível da angiogénese quando comparado com outros anticorpos endoteliais^{40,41,42,43,44,45}.

Há evidências que sugerem que a endoglina é um alvo terapêutico potencial em neoplasias malignas sólidas. Estudos recentes indicam que imunoterapia passiva com anti-corpos monoclonais anti-endoglina podem diminuir o crescimento tumoral e vacinas de DNA xenogénicas homólogas podem inibir imunidade anti-tumoral

cruzada^{46,47}. Não existem estudos publicados sobre o papel da endogлина, como marcador da densidade microvascular, como factor prognóstico ou biomarcador terapêutico nos tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreáticos.

2 - OBJETIVOS

O principal objectivo deste estudo preliminar consistiu na avaliação da relação entre a densidade de microvasos determinada pela endogлина (CD105) com o prognóstico e com o sistema de estadiamento dos GEP-NETs proposto pela ENETS. Foram objectivos secundários: correlacionar a densidade de microvasos determinada pela endogлина (CD105) e pelo CD31; e relacionar a densidade de microvasos com o índice proliferativo determinado pela expressão de Ki-67 nas células tumorais de GEP-NETs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Selecção e caracterização de casos

A selecção dos doentes com GEP-NETs, seguidos e tratados no Hospital de São João do Porto, foi efectuada através da consulta dos ficheiros clínicos e informáticos do Serviço de Anatomia Patológica e Registo Oncológico, dos Serviços de Cirurgia Geral e do arquivo informático do Departamento de Análise de Gestão do Hospital.

O material anátomo-patológico arquivado e os ficheiros clínicos dos casos de GEP-NETs identificados foram re-avaliados.

Foram identificados 145 casos, desde Janeiro de 1978 até Dezembro de 2006, com GEP-NETs submetidos a cirurgia de ressecção e/ou biópsia incisional ou excisional. Foram excluídos os tumores neuroendócrinos de outras localizações, bem como os casos sem material anátomo-patológico disponível - de produtos de ressecção ou de biópsia (25 casos). Foram revistos cortes corados com Hematoxilina-Eosina e avaliada a expressão de cromogranina A, sinaptofisina e NSE.

Para a análise preliminar da relação da angiogénese com o estágio dos GEP-NETS, com o prognóstico e com o índice proliferativo Ki-67, foram utilizados 39 casos.

Foram avaliadas as seguintes características em cada caso: localização; modo de apresentação; estadiamento clínico; tipo de ressecção; dimensão; metastização ganglionar; metastização à distância; índice Ki-67; expressão de CD105, CD31 e cromogranina e sobrevida.

3.2 - Avaliação Patológica

Foi reavaliado todo o material disponível em arquivo no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital São João do Porto, com estudo histológico de cortes de 4 μ corados com Hematoxilina-Eosina. O estadiamento dos casos foi efectuada de acordo com a proposta de estadiamento TNM da ENETS^{4,5}.

Para a avaliação das amostras dos 39 casos seleccionados foi efectuada um "tissue microarray" (TMA). As áreas representativas dos tumores foram seleccionadas a partir das lâminas de Hematoxilina-Eosina. As amostras (2-3

amostras/caso) seleccionadas dos blocos originais foram depois depositadas no bloco TMA.

3.3 - Anticorpos

Anticorpo/clone	Origem
CD 105 - Monoclonal Mouse Anti-Human CD 105, Clone SN6h	DakoCytomation, Inc; Carpinteria
CD 31	Novocastra
Ki-67	Clone SP6; Neomarkers

3.4 - Imuno-histoquímica

A avaliação da expressão de endoglin e CD31 foi efectuada em cortes de 2µm colocados em lâminas adesivadas e secos na estufa a 60°C durante 1 hora. As lâminas foram deparafinizadas em SUB-X Clearing Agent (Surgipath TM)[®] e hidratadas até à água corrente com etanol.

Para a recuperação antigénica do CD 31 e CD 105, foi utilizado tampão Citrato com ph=6,0 a 98°C durante 40 minutos a 37 °C.

O estudo imuno-histoquímico foi realizado utilizando um sistema de detecção automático - Autostainer - baseado no método de polímero.

O bloqueio da peroxidase endógena foi efectuado com peróxido de hidrogénio a 0,3% em metanol.

Após incubação com o anticorpo primário as lâminas ficaram a incubar com o polímero durante 30 minutos à temperatura ambiente – Kit DakoRealTMEnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+Rabbit/Mousse-Dako-Denmark A/S.

Posteriormente, após lavagem em água corrente durante cinco minutos, procedeu-se ao contraste nuclear com Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. Efectuou-se, de seguida, desidratação das lâminas com uma série crescente de álcoois, diafanização com SUB-X Clearing Agent (Surgipath TM)[®] e, por fim, montagem definitiva com meio de montagem (Mounting Medium, Richard-Allan Scientific).

Como controlo positivo da técnica imuno-histoquímica foram utilizadas amostras de placenta (sincicio-trofoblasto), para o anticorpo CD 105, e amostras de apêndice ileo-cecal, antro gástrico e íleon, para o anticorpo CD 31.

3.5 - Quantificação

O procedimento de contagem foi efectuado sem conhecimento do estado clínico-patológico nem do anticorpo utilizado em cada caso. As lâminas foram revistas aleatoriamente, de modo a evitar associação de resultados. Após avaliação de cada caso a baixa ampliação (x40), foram seleccionadas por 2 observadores três áreas da neoplasia com maior número de microvasos ("*hot spots*"). Posteriormente, os dois observadores, independentemente, avaliaram os casos, efectuando contagens de microvasos em campos de grande ampliação (x400 - 0.15mm²). Foram efectuadas 1 a 3 contagens por caso, dependendo da dimensão do *hotspot*. Cada célula ou *spot*, identificada pelo marcador imunohistoquímico, foi considerada positiva, independentemente da presença de lúmen vascular⁴⁸. O maior número de vasos contados por caso foi utilizado na análise estatística. Foi avaliado o valor de K entre os dois observadores. Os casos discordantes (> 10% na contagem de microvasos) foram re-avaliados para estabelecer consenso final.

3.6 - Análise estatística

Para o processamento da informação foi criada uma base de dados informatizada, aferida aos objectivos do trabalho e características metodológicas.

A análise estatística foi realizada com software SPSS 17™. Utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para as comparações não paramétricas devido à ausência de distribuição normal das variáveis em estudo, o teste Log-Rank para a análise das sobrevidas, o coeficiente de correlação de Pearson para avaliação da correlação estatística entre a densidade microvascular determinada pela expressão de CD 105 e a densidade vascular determinada pelo CD 31, e o coeficiente de correlação intra-classe para avaliação da reprodutibilidade da avaliação quantitativa dos resultados imuno-histoquímicos.

O nível de probabilidade inferior a 0,05 (p) foi considerado como o limite de significância estatística.

4 – RESULTADOS

4.1 Casuística

A série original deste estudo consistia em 145 doentes com GEP-NETs bem diferenciados, diagnosticados de 1978 – 2006 (*comunicação, publicada em abstract, no Livro de Resumos da reunião internacional - 4th Annual ENETS Conference – Barcelona, Espanha – 15-17 de Março de 2007*), com a idade mediana de 52 anos no momento do diagnóstico (extremos etários: 8 – 87 anos de idade); 49,6% dos doentes eram do sexo masculino e 50,4% do sexo feminino. A relação sexo M/F foi de 0,98; 10,3% das neoplasias apresentavam-se com síndromes endócrinas de hiperfunção. A frequência relativa por órgão foi: estômago (11%); duodeno (11.7%); pâncreas (25.6%); intestino delgado (11.7%); apêndice ileocecal (31.8%); cólon (2.6%) e recto (4.8%); 73,8% dos doentes apresentavam doença local, 15,2% doença locorregional e 9% metástases à distância. A taxa de sobrevivência aos 5 anos dos pacientes da nossa série com metástases hepáticas (40.5%), foi significativamente ($p = 0.007$) inferior à da dos pacientes sem metástases hepáticas (85.8%) (*comunicação, publicada na forma de abstract, no Livro de Resumos da reunião internacional - 5th Annual ENETS Conference – Paris, França – 6-8 de Março de 2008*).

4.2 Características clínico-patológicas

Para este estudo usaram-se 39 doentes com material representativo de GEP-NETS. A idade mediana dos doentes era 42 anos no momento do diagnóstico (extremos etários: 8 – 81 anos de idade); 18 doentes (46,2%) eram do sexo masculino (M) e 21 (53,8%) do sexo feminino (F). A relação sexo M/F foi de 0,86 (Gráfico 1).

Sexo

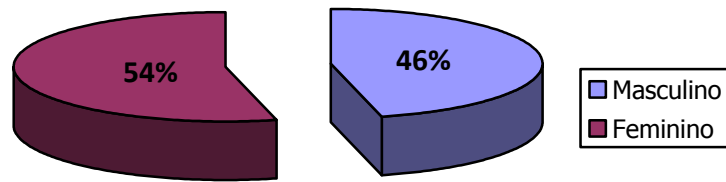


Gráfico 1: Distribuição, por sexo, dos doentes com GEP-NETs

A frequência das neoplasias, por classificação topográfica embriológica, foi: intestino anterior (n=9; 23%), intestino médio (n=29; 74%) e intestino posterior (n=1; 3%) – Gráfico 2.

Classificação topográfica embriológica

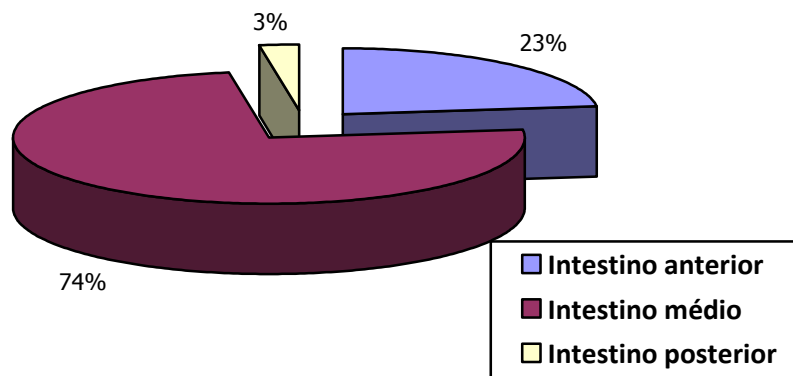


Gráfico 2: Distribuição topográfica embriológica dos TNEs

A frequência relativa por órgão foi: estômago (n=1; 2,6%); duodeno (n=2; 5,1%); pâncreas (n=6; 15,4%); intestino delgado (n=4; 10,2%); apêndice ileocecal (n=25; 64,1%) e cólon (n=1; 2,6%) – Gráfico 3.

Frequência por órgão

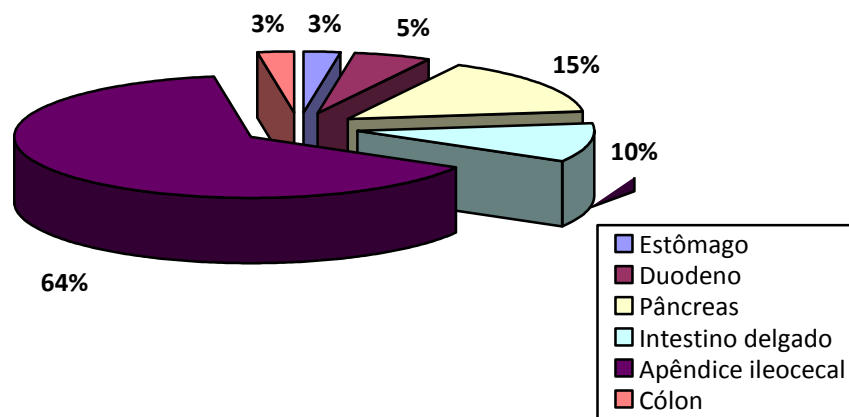


Gráfico 3: Distribuição, por órgão envolvido pelo GEP-NET

Relativamente à funcionalidade, 5,1% das neoplasias apresentavam-se com síndromes endócrinas de hiperfunção (1 insulinoma; 1 glucagonoma).

84,6% dos doentes apresentavam doença localizada, 10,3% doença locorregional e 5,1% metástases à distância no momento do diagnóstico (Gráfico 4).

Progressão da doença (apresentação)

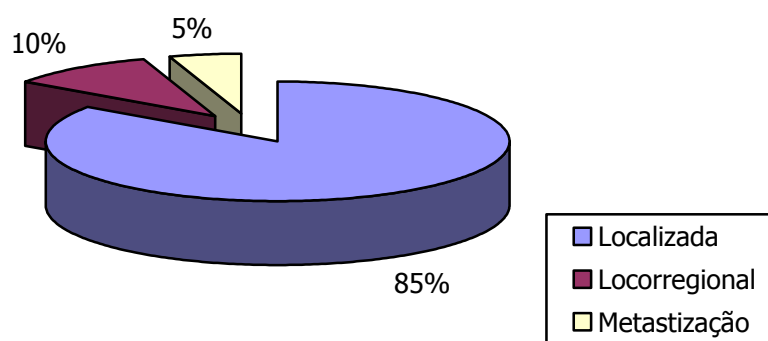


Gráfico 4: Distribuição, por tipo de apresentação

O tempo de seguimento mediano dos 39 doentes foi de 117,5 meses (extremos: 0 – 273 meses). 5/39 doentes (12,5 %) morreram neste período de *follow-up*. 5 doentes (12,5 %) foram perdidos para *follow-up*. O gráfico 5 apresenta a curva de sobrevivência dos casos.

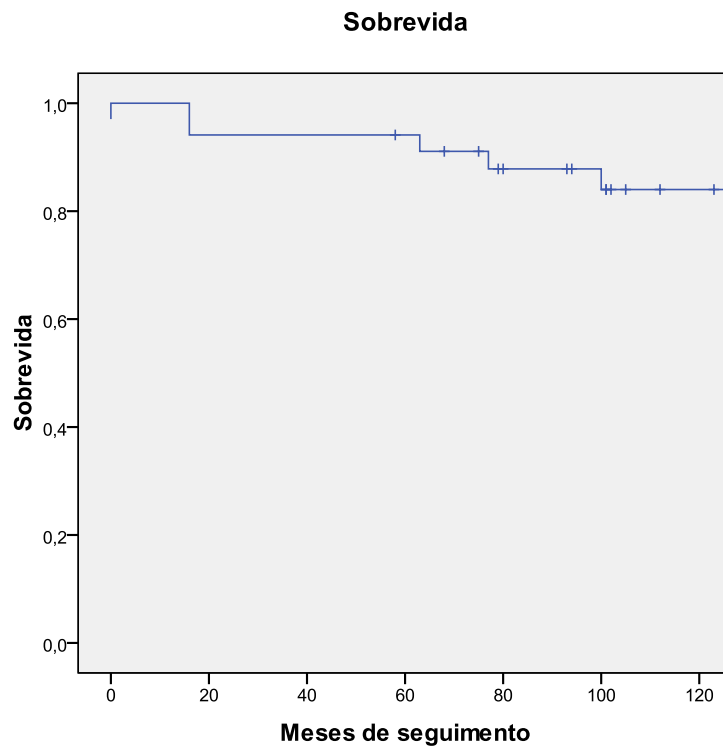


Gráfico 5: Curva de sobrevida dos doentes com GEP-NETs

Os doentes com tumores neuroendócrinos com metastização ganglionar ou à distância apresentaram um prognóstico significativamente pior relativamente a doentes sem metastização ($p < 0,005$) - Gráfico 6.

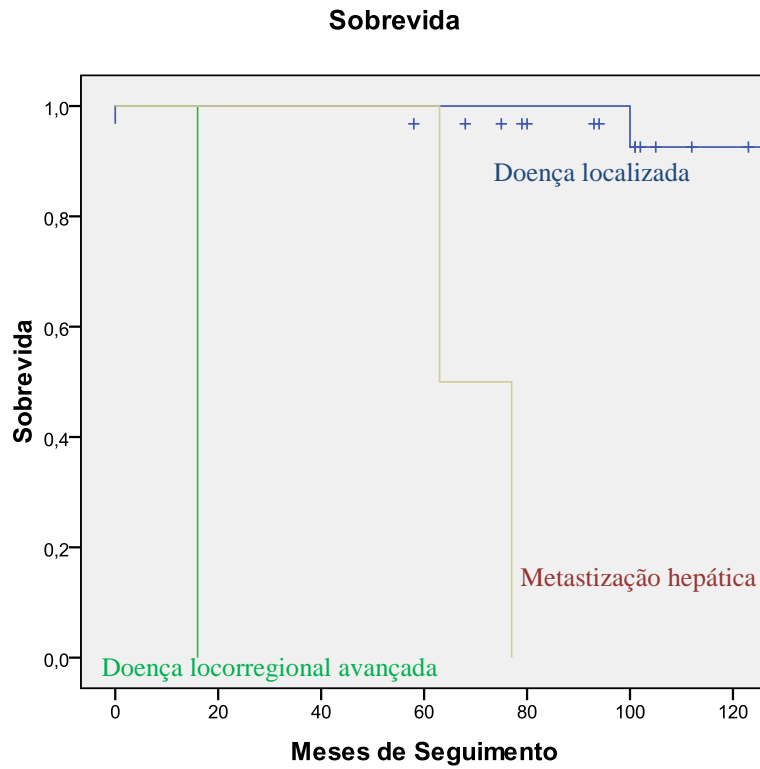


Gráfico 6: Curvas de sobrevida dos doentes com GEP-NETs: com doença localizada, com metastização ganglionar e com metastização à distância

4.2.1 CD 105

Não foram identificados microvasos com expressão de CD105 nos tecidos sem neoplasia. Nas neoplasias, a expressão deste marcador consistia em depósitos vasculares citoplasmáticos castanhos de intensidade variável (Figura 1.). Na Figura 2 observa-se um tumor neuroendócrino sem expressão microvascular de CD105.

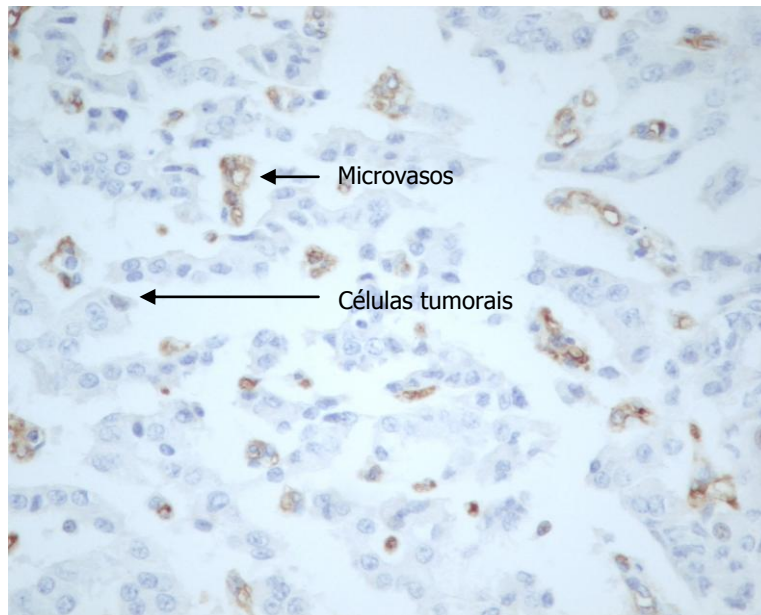


Figura 1. Microvasos com expressão de CD105 num tumor neuroendócrino (x400 - 0.15mm²).

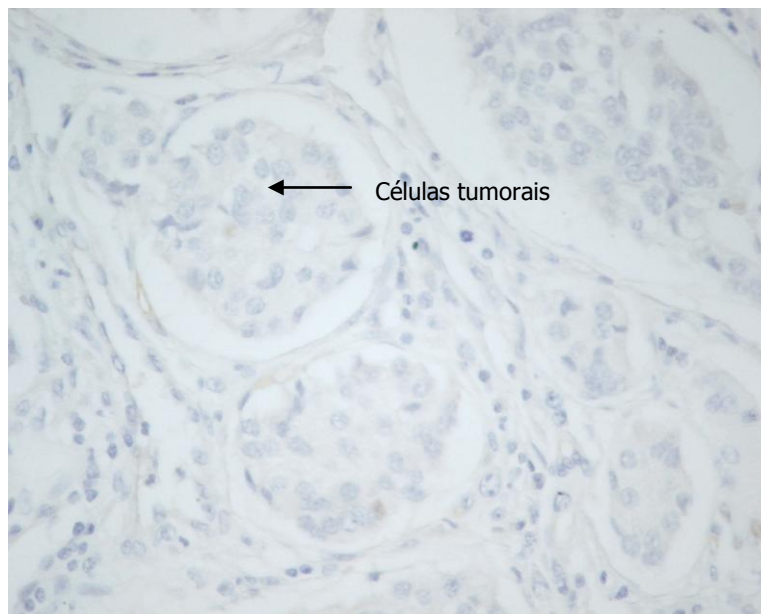


Figura 2. Ausência de expressão de CD105 num tumor neuroendócrino (x400 - 0.15mm²).

A expressão de CD105 foi observada em tumores com doença locorregional avançada, com metastização à distância e com estadiamento clínico-patológico menos avançado (T1N0M0).

A mediana da densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105 foi de 3 / cga.

Como se pode verificar pelo Gráfico 7, a expressão de CD105 relacionou-se com o órgão envolvido ($p=0,03$), sendo os tumores do apêndice ileocecal os com menor densidade microvascular e os tumores endócrinos do pâncreas os com maior densidade microvascular.

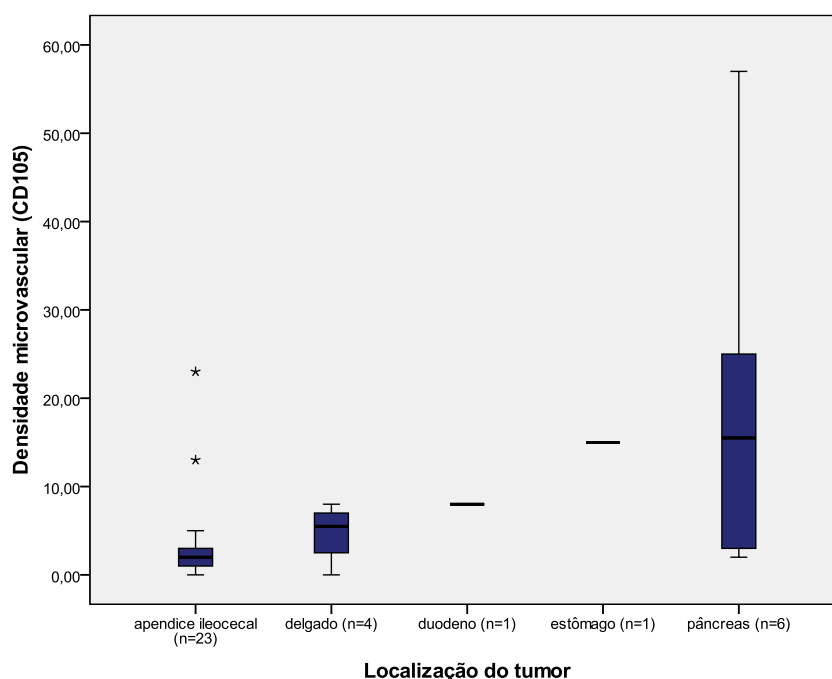


Gráfico 7: Densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, do TNE em função do órgão envolvido pelo tumor.

Foram também verificadas diferenças com significado estatístico na densidade de microvasos relativamente ao estadiamento do tumor ($p=0,024$). Foram excluídos desta análise os tumores TxN0M0 (7 casos). No Gráfico 8 foram excluídos os estádios com menos do que 2 casos.

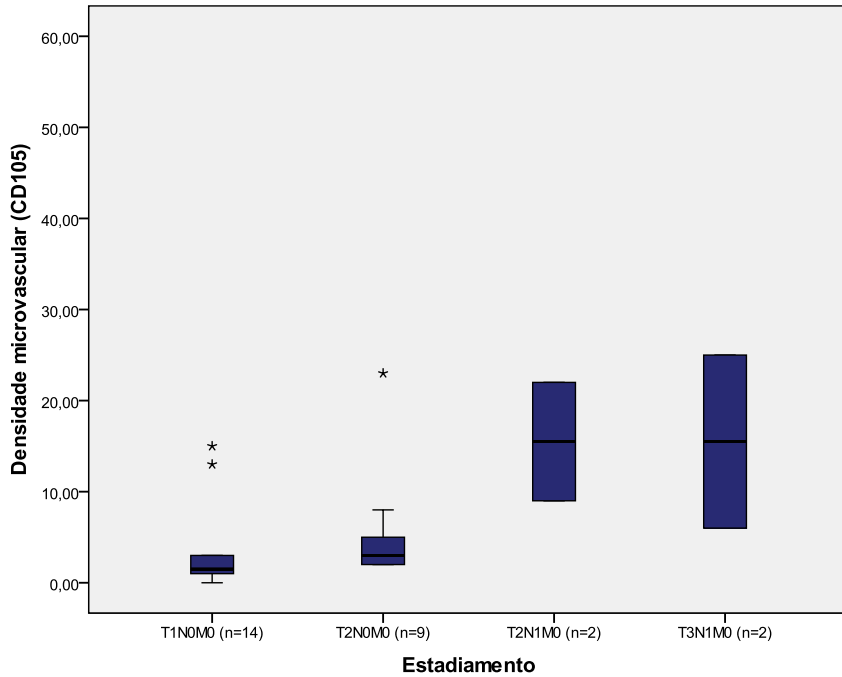


Gráfico 8: Densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, do TNE, em função do estadiamento do tumor.

Os tumores com metastização ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade microvascular do que os tumores não metastizados, mas sem significado estatístico ($p=0,087$; Gráfico 9).

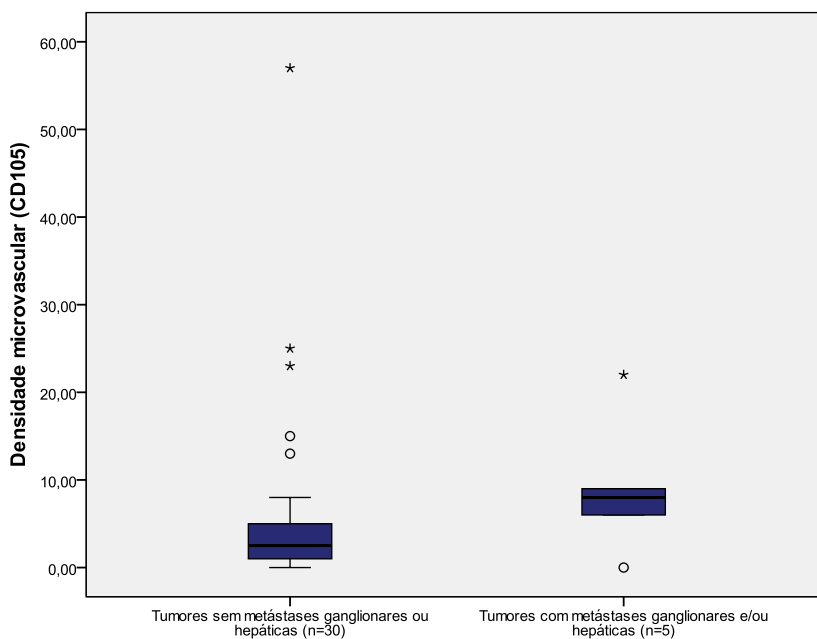


Gráfico 9: Densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, do TNE em função da presença, ou não, de metastização ganglionar e/ou hepática

Quando se subdividiram os tumores em localizados, locorregionais (com metastização ganglionar) e metastizados (com metastização à distância, nomeadamente hepática) verificou-se que não havia diferenças com significado estatístico ($p=0,143$) – Gráfico 10.

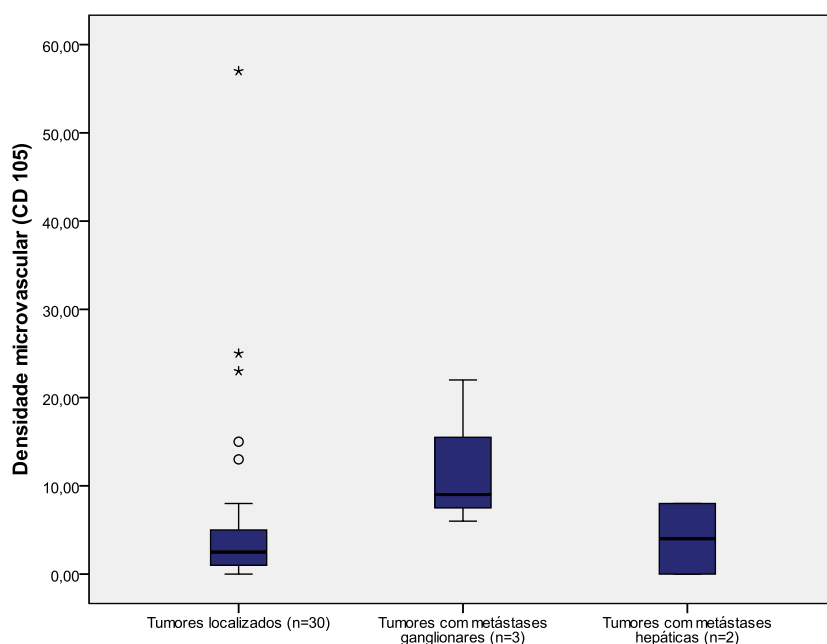


Gráfico 10: Densidade microvascular do TNE, determinada pela expressão de CD105, em função do tipo de apresentação

A densidade microvascular dos tumores, determinada pela expressão de endoglina, relacionou-se significativamente ($p < 0,005$) com a sobrevivência dos doentes (análise univariada). Não foi efectuada análise multivariada devido ao pequeno número de casos.

Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade microvascular, determinado pela expressão de CD105, relativamente ao sexo nem com a presença ou ausência de síndrome de hiperfunção hormonal.

4.2.2 CD 31

Foram observados vasos com expressão de CD31 nos tecidos neoplásicos e não neoplásicos. A mediana da densidade vascular dos TNEs desta série,

determinada pela expressão de CD31, foi de 13,0 /cga.

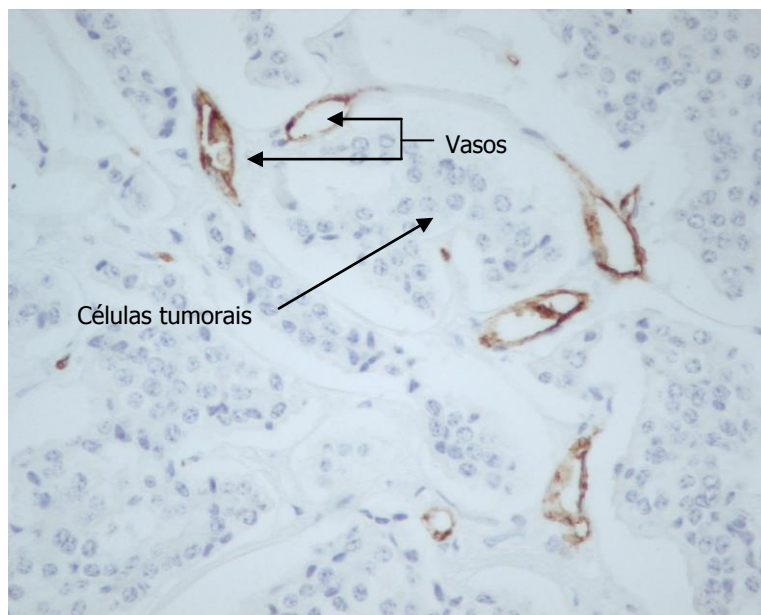


Figura 3. Vasos com expressão de CD31 num tumor neuroendócrino (x400 - 0.15mm2).

Foi verificada correlação significativa ($p = 0,01$; coeficiente de correlação de Pearson = 0,721) entre a densidade microvascular determinada pela expressão de CD 105 e a densidade vascular determinada pelo CD 31 – Gráfico 11.

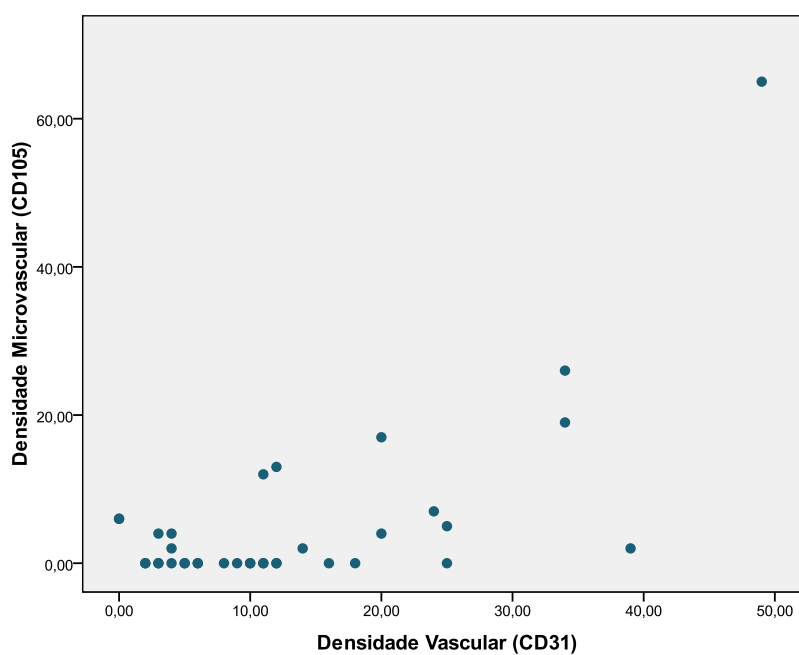


Gráfico 11: Correlação entre a densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, e vascular, determinada pela expressão de CD31.

Dois tumores endócrinos pancreáticos associados a síndromes endócrinos de hiperfunção (insulinoma e glucagonoma) apresentavam maior número de vasos com expressão de CD31, embora sem significado estatístico, do que os tumores sem síndromes de hiperfunção ($p=0,053$) – Gráfico 12.

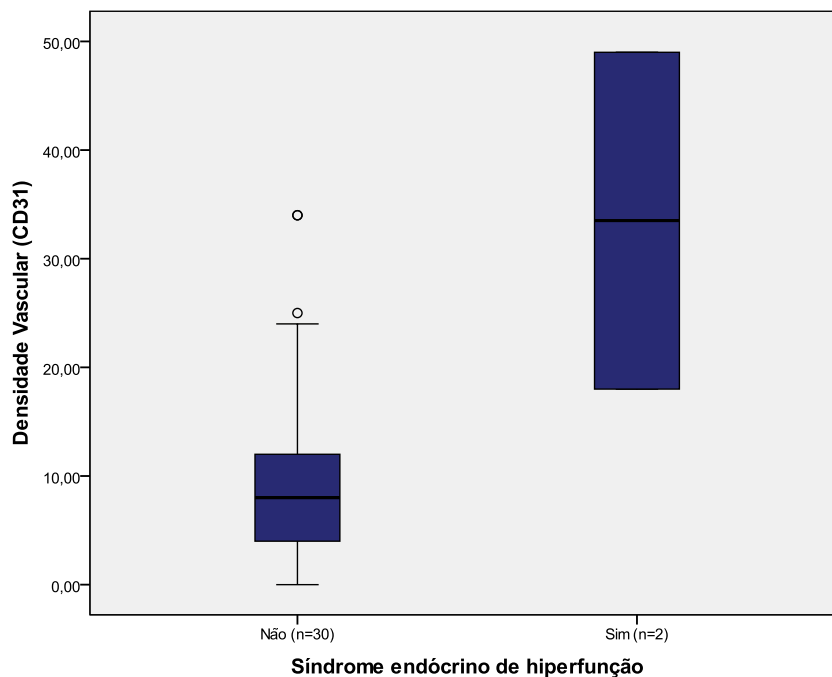


Gráfico 12: Distribuição da densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, de acordo com a presença/ausência de síndrome endócrino de hiperfunção

Foram verificadas diferenças significativas na densidade vascular, determinado pela expressão de CD31, consoante a localização do tumor ($p=0,019$) - Gráfico 13.

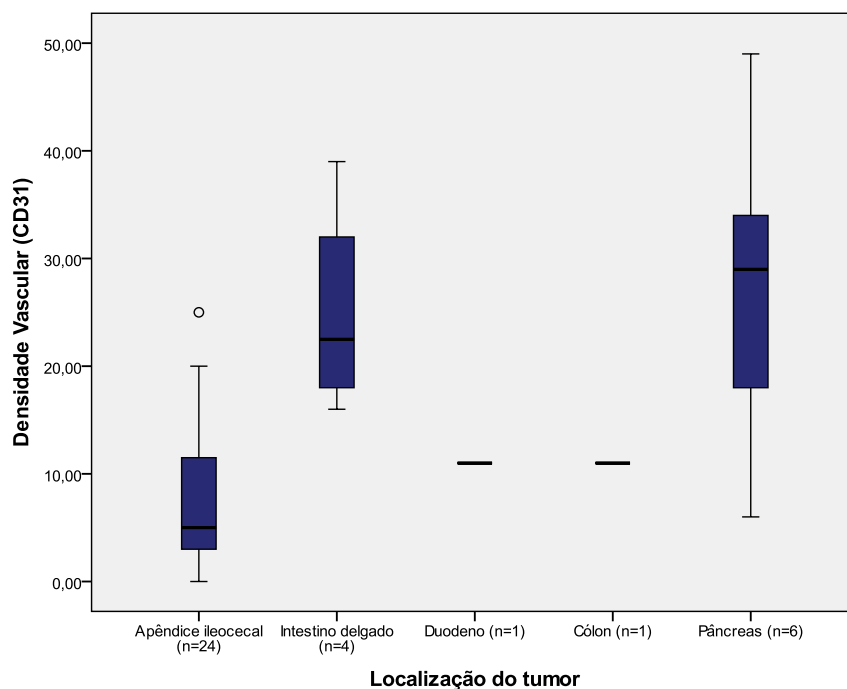


Gráfico 13: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função do órgão envolvido pelo tumor

Verificou-se um aumento da densidade vascular com o estágio da neoplasia, ou seja, os tumores com estágio (proposta ENETS de estadiamento TNM^{4,5}) superior apresentavam maior número de vasos relativamente a tumores com estágio inferior ($p=0,014$) – Gráfico 14. Foram excluídos da análise os tumores TxN0M0. No Gráfico 14 foram excluídos os estádios com menos do que 2 casos.

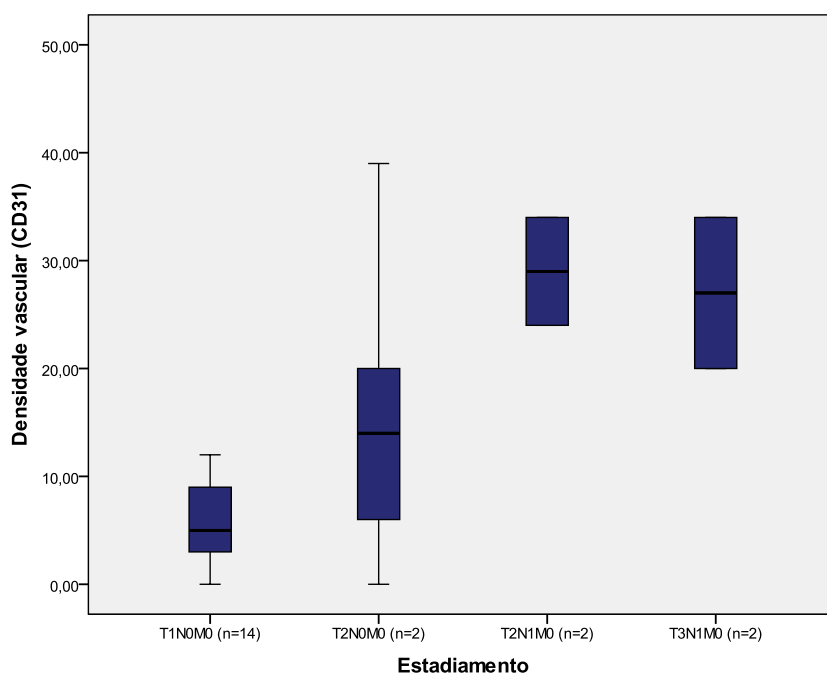


Gráfico 14: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função do estadiamento do tumor

Verificou-se que os tumores com metastização ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade vascular do que os tumores sem metástases ($p=0,01$; Gráfico 15).

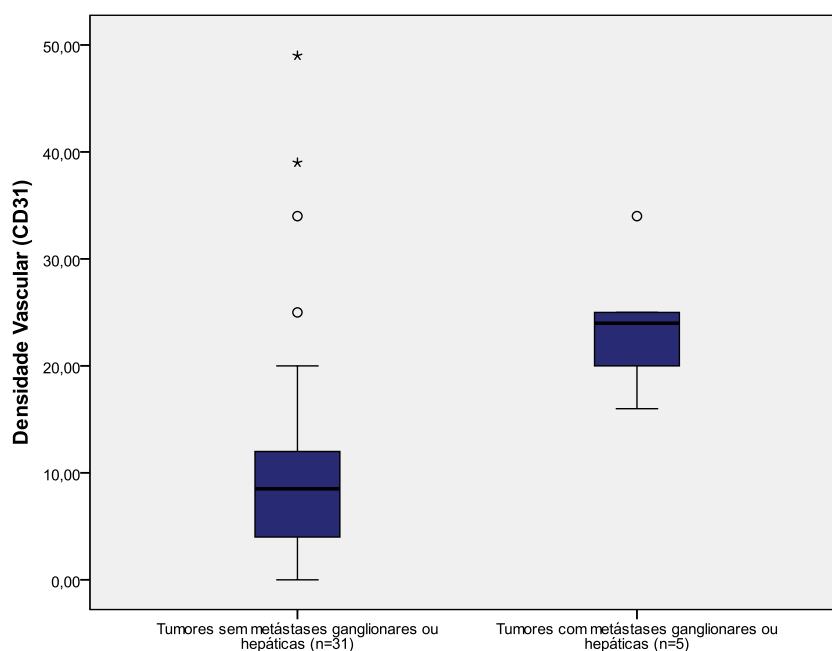


Gráfico 15: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função da presença/ausência de metastização, ganglionar e/ou à distância, no momento do diagnóstico

Quando se subdividiram os tumores em localizados, locorregionais (com metastização ganglionar) ou metastizados (com metastização à distância) verificou-se diferenças com significado estatístico relativamente à densidade vascular ($p=0,036$; Gráfico 16). Os dois doentes com metástases hepáticas apresentavam tumores neuroendócrinos do intestino delgado.

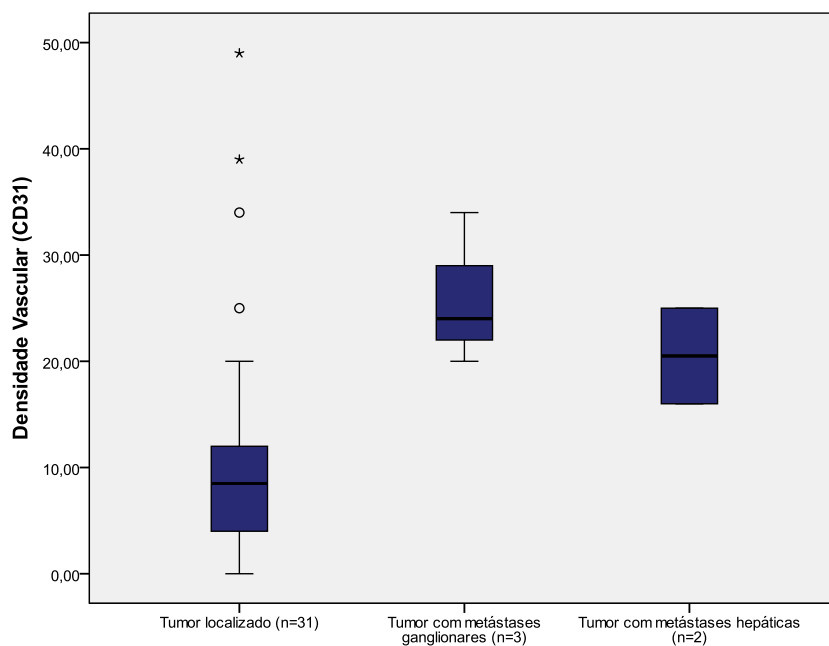


Gráfico 16: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função da presença de metastização ganglionar ou à distância

A avaliação da sobrevida dos doentes, tendo em consideração a densidade vascular determinada pela expressão de CD31, revelou diferenças significativas ($p < 0,005$ - análise univariada). Não foi efectuada análise multivariada devido ao pequeno número de casos.

Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade vascular relativamente ao sexo ou à idade dos doentes.

4.2.3 Ki-67

Como se pode verificar pelo Gráfico 17, todos os tumores apresentavam um baixo índice proliferativo, incluindo os com metastização ganglionar e à distância (valor médio $< 1\%$; mediana $< 1\%$; variação: 0 - 7%).

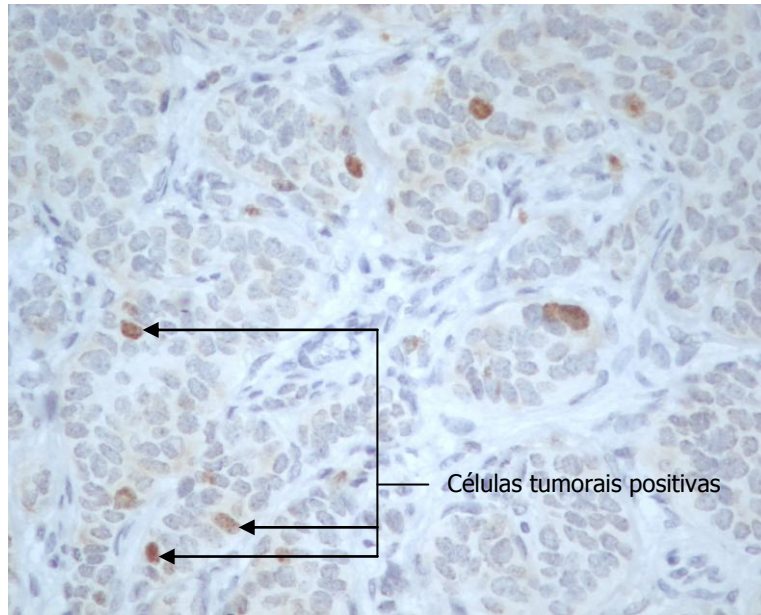


Figura 4. Expressão tumoral de Ki-67 - campo de grande ampliação (x400 - 0.15mm²).

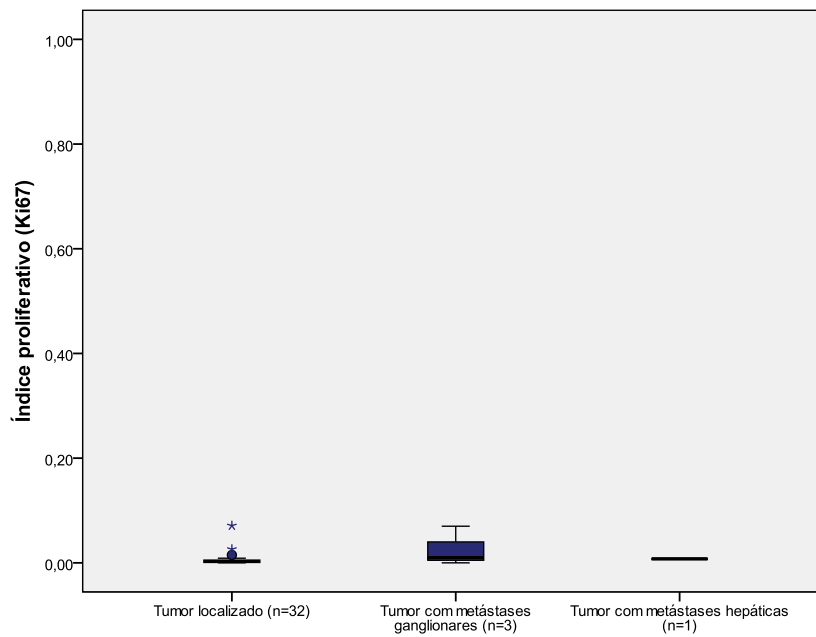


Gráfico 17: Índice proliferativo, determinado pela expressão de Ki-67, em função da presença/ausência de metastização ganglionar e/ou à distância

Não foram verificadas diferenças com significado estatístico no índice proliferativo, determinado pelo Ki-67, relativamente ao sexo, à idade, à funcionalidade do tumor, ao órgão envolvido nem ao estadiamento do tumor. Não foi

verificada relação estatisticamente significativa entre o índice proliferativo determinado pelo Ki-67 e a densidade microvascular / vascular, determinadas respectivamente pela expressão de CD105 e CD31.

4.2.4 Tumores endócrinos do pâncreas

Apesar de 4 dos 6 doentes com tumores endócrinos do pâncreas apresentarem doença locorregional avançada (2 casos com neoplasias T3 e 2 casos com metastização ganglionar), nenhum dos doentes com tumor endócrino do pâncreas apresentava metastização à distância.

Em três doentes foram efectuadas duodenopancreatectomias cefálicas, em 2 enucleações pancreáticas, e num, pancreatectomia caudal.

Dois dos doentes com tumores endócrinos do pâncreas apresentavam síndromes endócrinas de hiperfunção associados, num a insulinoma e noutra a glucagonoma.

Dois dos 6 doentes foram perdidos e os restantes estão vivos (*follow-up* médio de 186 meses; variação: 123 – 210 meses).

Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade de microvasos/vasos, determinados respectivamente pela expressão de CD105 e CD31, ou no índice proliferativo, determinado pelo Ki-67, relativamente à funcionalidade do tumor, ao sexo, à idade do doente nem ao estágio do tumor.

Os tumores endócrinos do pâncreas foram os que apresentaram maior densidade microvascular/vascular (Gráficos 7 e 12).

4.2.5 Tumores neuro-endócrinos do intestino médio (excluindo apêndice ileocecal)

Os tumores neuroendócrinos do intestino delgado foram diagnosticados em doentes que desenvolverem sinais/sintomas de obstrução intestinal. Todos os doentes foram submetidos a enterectomia segmentar, com ou sem anastomose primária.

Três dos 4 doentes com tumores neuroendócrinos do delgado apresentavam

doença avançada (1 doente com doença locorregional avançada – T3N1M0; 2 doentes com metastização à distância).

Os dois doentes com metástases hepáticas tiveram uma sobrevida de 63 e 77 meses, respectivamente.

Os doentes com tumores do ileon com metastização à distância (hepática), apresentavam menor densidade microvascular/vascular, determinadas respectivamente pela expressão de CD105 e CD31, do que outros tumores sem metastização hepática, nomeadamente tumores endócrinos do pâncreas.

Apesar de $\frac{3}{4}$ dos doentes com tumores neuroendócrinos do delgado da série apresentarem doença avançada, todos apresentavam baixo índice proliferativo (Ki-67 < 2%).

4.2.6 Tumores neuro-endócrinos do apêndice ileocecal

Os doentes, excepto um, foram submetidos a cirurgia após o diagnóstico de apendicite aguda. Nenhum destes doentes foi submetido a hemicolectomia direita.

Num doente, o tumor foi diagnosticado em peça de proctocolectomia total por colite ulcerosa.

Todos os doentes apresentavam doença localizada: T1N0M0 ou T2N0M0.

Não se verificou nenhum caso de recidiva ou de mortalidade no período de seguimento médio de 153,4 meses (mediana de 174,5 meses; variação: 58 – 253 meses) destes doentes.

Foram verificadas diferenças, embora sem significado estatístico, na densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, relativamente ao estadiamento da neoplasia, apresentando os tumores T2 maior densidade microvascular do que os tumores T1, embora sem significado estatístico ($p=0,057$).

Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade vascular, determinada pela expressão de CD31, nem no índice proliferativo, determinado pelo Ki-67, relativamente ao estadiamento da neoplasia.

Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade microvascular / vascular, determinadas respectivamente pela expressão de CD105 e CD31, nem no índice proliferativo, determinado pelo Ki-67, relativamente à idade dos doentes.

4.2.7 Reprodutibilidade da avaliação quantitativa dos resultados imuno-histoquímicos

Para avaliar a reprodutibilidade na determinação da densidade microvascular / vascular foi calculado o coeficiente de correlação entre os dois observadores: Autor (Interno Complementar de Cirurgia Geral) e Interno Complementar de Anatomia Patológica.

Na expressão de CD105 o coeficiente de correlação intra-classe entre os dois observadores foi de 0,970, com um intervalo de confiança a 95% de [0,932; 0,986] – Gráfico 19. Os limites de concordância variaram entre [-6,4 e 4,1].

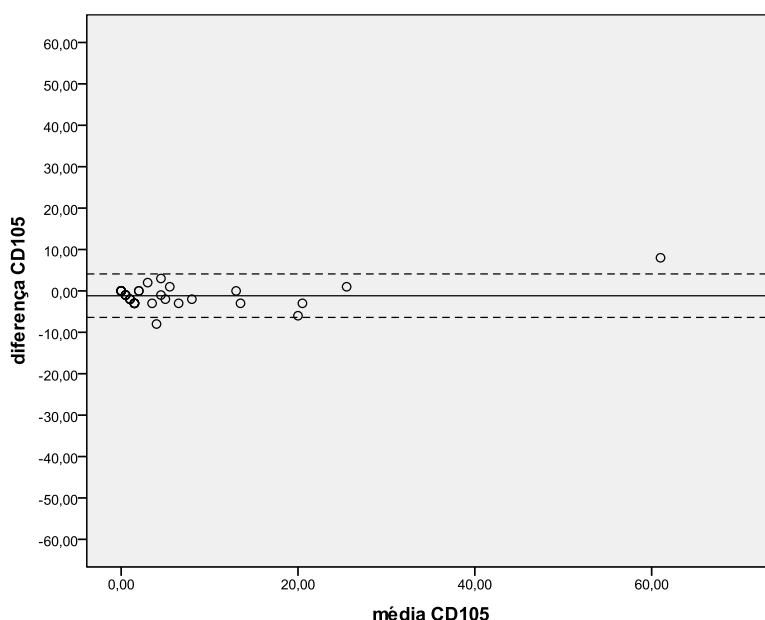


Gráfico 18: Correlação intra-classe entre os dois observadores, na avaliação da densidade microvascular, determinada pela expressão de endogлина

Na expressão de CD31 o coeficiente de correlação intra-classe entre os dois observadores foi de 0,892, com um intervalo de confiança a 95% de [0,768;0,948] – Gráfico 19. Os limites de concordância variaram entre [-13,5 e 8,5].

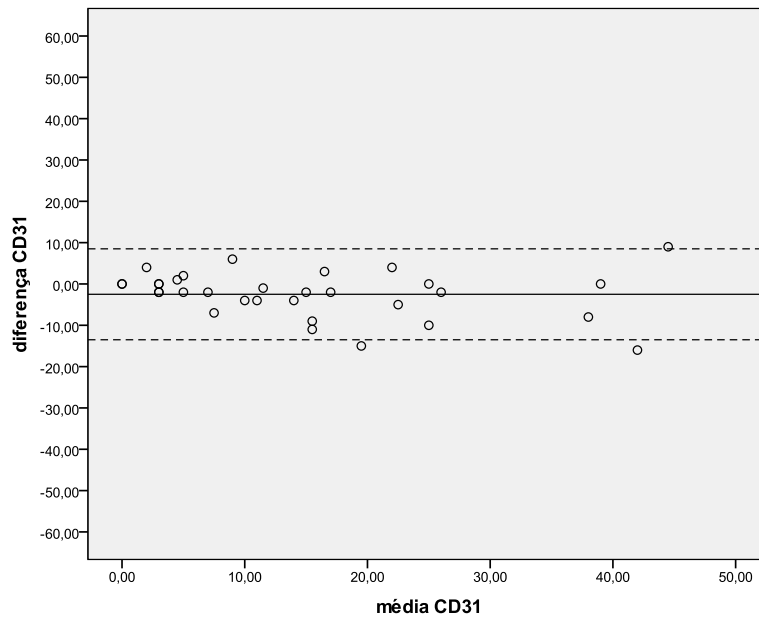


Gráfico 19: Correlação intra-classe entre os dois observadores, na avaliação da densidade vascular, determinada pela expressão de CD31

5– DISCUSSÃO

Os GEP-NETs são tumores raros constituindo aproximadamente 2 % das neoplasias do sistema gastro-intestinal².

A ENETS desenvolveu uma proposta de estadiamento TNM para os GEP-NETs que ainda se encontra em validação para a aplicação à clínica e em ensaios de doentes com GEP-NETs^{4,5}. No entanto, uma vez que grande parte dos dados apresentados na literatura, incluindo os do nosso grupo (*estudo publicado em abstract, no Livro de Resumos da reunião internacional - 5th Annual ENETS Conference – Paris, França – 6-8 de Março de 2008*), demonstram a importância prognóstica do novo sistema de classificação TNM da ENETS em pacientes com GEP-NETs, decidiu-se utilizá-lo no presente trabalho.

Os GEP-NETs são tumores habitualmente indolentes, no entanto, alguns são indiferenciados e biologicamente mais agressivos. Em 73,8% dos doentes da nossa casuística a doença apresentava-se localizada, em 15,2% com extensão locorregional e em 9% com metástases à distância. A frequência de metastização à distância nesta série de GEP-NETs (9%) foi inferior à relatada em séries maiores (25-90%).

Relativamente à nossa amostra, reflectindo a frequência de tumores neuroendócrinos do apêndice ileocecal, 84,6% dos doentes apresentavam doença localizada, 10,3% doença locorregional e 5,1% metástases à distância no momento do diagnóstico.

A frequência relativa de tumores neuro-endócrinos do apêndice ileocecal da nossa série (31,8%), superior à relatada por grande parte de outros grupos, resulta provavelmente da nossa instituição, apesar de ser um Centro de Cuidados Terciários / Centro de Referência, ter um Serviço de Urgência de elevado volume.

A sobrevivência aos 5 anos, referida na literatura, dos GEP-NETs bem diferenciados é de 78-93% para os tumores localizados, 72-74% para os tumores loco-regionais e 19-38% para os tumores metastizados³. Para a análise da sobrevida global e sobrevida livre de doença é essencial um seguimento rigoroso dos doentes e períodos de *follow-up* longos. O tempo de seguimento médio na nossa série foi de 140,8 meses, mediana de 117,5 meses (extremos: 0 – 273 meses); 5/39 doentes (12,5 %) faleceram; 5 doentes (12,5 %) foram perdidos para *follow-up*; aos 10 anos de *follow-up*, mais de 80% dos doentes encontravam-se vivos.

Globalmente os resultados de sobrevida da nossa série, confirmam que se trata de GEP-NETs bem diferenciados com crescimento indolente. Como esperado, o

índice proliferativo Ki-67 observado foi baixo, quer em tumores sem metástases quer com metástases, o que pode explicar a ausência de significado estatístico observada entre o índice proliferativo Ki-67 e o estágio dos GEP-NETs desta série.

Apesar dos avanços no conhecimento biológico destes tumores, as taxas de sobrevivência têm-se mantido estáveis nas últimas 5 décadas³. Actualmente, a panóplia de tratamentos inclui: cirurgia (a única forma de tratamento potencialmente curativa), análogos da somatostatina, análogos da somatostatina associados a radioisótopos, terapêutica biológica com interferão alfa, e a quimioterapia^{1,6,49}. Muitos estudos têm demonstrado que a inibição da angiogénese se associa a diminuição do crescimento e da metastização numa variedade de neoplasias, no entanto, o papel dos inibidores da angiogénese nos GEP-NETs continua por esclarecer.

Para além da importância da angiogénese na determinação do prognóstico e da sua aplicabilidade terapêutica, a avaliação não invasiva da microvascularização tumoral, por tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear ou tomografia por emissão de positrões, usando marcadores específicos, como marcadores de moléculas de superfície do endotélio (integrinas, endogлина, VEGF) poderá ter, no futuro, um papel importante no diagnóstico, nomeadamente de recidivas, e na monitorização da resposta terapêutica das neoplasias^{50,51}.

Numa tentativa de procurar esclarecer a controvérsia do papel da angiogénese nos GEP-NETs decidimos avaliar, neste estudo preliminar, a relação entre angiogénese, estágio e prognóstico de GEP-NETs.

Um dos métodos de avaliação da angiogénese consiste na determinação da densidade vascular. A principal limitação na avaliação da angiogénese através da determinação da densidade vascular decorre do tipo de marcador utilizado^{35,36,37,38}. De modo a avaliar a relação entre a angiogénese, o prognóstico e estadiamento, utilizou-se um marcador pan-endotelial, o CD31, e o anticorpo monoclonal CD 105 (endogлина) que é um marcador com especificidade tecidual acentuada, preferencialmente expresso nas células endoteliais dos tecidos em processo de angiogénese activa. De facto, este estudo constitui um trabalho original utilizando o CD105 como marcador para a avaliação da angiogénese em GEP-NETs. Para além da avaliação tecidual da endogлина é possível a sua determinação plasmática que não foi determinada neste estudo retrospectivo. Níveis plasmáticos aumentados de endogлина têm sido descritos em doentes com carcinomas colorectais ou da mama

metastizados. Os resultados têm sugerido que os níveis plasmáticos de endogлина podem ser utilizados na identificação precoce de metástases e na avaliação da resposta à terapêutica anti-angiogénica^{52,53}.

No nosso estudo, e de acordo com o descrito na literatura^{41,42,43,45} não detectamos microvasos com expressão de CD105 nos tecidos não neoplásicos.

A variabilidade e subjectividade associada à determinação da densidade microvascular usando a expressão de CD105 é uma das causas possíveis para a divergência entre os estudos publicados noutros tipos de neoplasias. Neste estudo verificamos um coeficiente de correlação significativo entre dois observadores independentes, que suporta os nossos resultados.

A endogлина parece estar expressa em TNEs em estádios precoces e a sua expressão parece aumentar com o aumento do estágio do TNE. De facto verificamos que a mediana da densidade microvascular determinada pela expressão de CD105 era baixa em TNEs do apêndice ileocecal em estádios precoces e era maior em TNEs do pâncreas em estádios avançados.

Adicionalmente verificou-se que os tumores com metastização ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade microvascular, mas sem atingir o nível de significância, quando comparados com TNEs não metastizados.

A associação significativa encontrada entre a densidade microvascular dos TNEs estudados com a sobrevida dos doentes parece dar relevância biológica à endogлина em GEP-NETs.

É interessante salientar que no nosso estudo observamos uma correlação estatisticamente significativa entre a densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, e vascular, determinada pela expressão de CD31. Verificamos também que a densidade vascular, tal como a densidade microvascular, dos tumores da nossa série se associa significativamente ao estágio dos tumores e à sobrevida dos doentes com GEP-NETs.

O escasso número de tumores hiperfuncionantes desta série impossibilita o esclarecimento da importância da angiogénese no estudo funcional dos GEP-NETs. No entanto, é interessante verificarmos que os tumores hiperfuncionantes (insulinoma e glucagonoma) tinham mais vascularização, mas sem significado estatístico, de que os outros GEP-NETs não funcionantes.

Os resultados da avaliação da angiogénese nesta série permite admitir que há possivelmente incorporação de vasos do hospedeiro e indução de neovasos na

patogénese dos GEP-NETs. O esclarecimento mais adequado desta redundância de mecanismos angiogénicos pode ajudar a explicar a controvérsia dos resultados terapêuticos descritos, designadamente em ensaios clínicos com anti-angiogénicos em GEP-NETs.

Parece portanto necessário que na implementação da terapêutica anti-angiogénica se considere a possibilidade de inibir múltiplos alvos e em regimes combinados. Admite-se, com base nestes conceitos, a importância de estudos de angiómica e de microarrays selectivos específicos por tipo neoplásico e/ou estágio de progressão tumoral.

Com base nos nossos resultados é provável que os doentes com GEP-NETs de alguns órgãos, com estádios avançados, sejam candidatos para terapêutica anti-angiogénica.

Muitos investigadores têm sugerido que os inibidores da angiogénese são citostáticos e não citotóxicos^{15, 16}. O facto de uma grande percentagem de tumores neuroendócrinos apresentar uma evolução lenta torna difícil a interpretação da eficácia terapêutica.

Estudos recentes têm indicado que algumas terapêuticas anti-angiogénicas aumentam a actividade citotóxica de alguns quimioterápicos devendo estes fármacos ser utilizados em associação. Estes autores referem os seguintes argumentos para a associação da terapêutica anti-angiogénica com a quimioterapia:

- Os fármacos anti-angiogénicos e citotóxicos actuam independentemente em diferentes alvos celulares;
- Os anti-angiogénicos diminuem a pressão intersticial e facilitam a difusão tecidual dos quimioterápicos;
- Os compostos anti-VEGF aumentam a permeabilidade vascular e o extravasamento dos agents citotóxicos.

É essencial a realização de estudos com maior número de doentes e tumores, nomeadamente estudos multicêntricos, para avaliar a reproductibilidade e a importância da densidade microvascular / vascular como marcador de resposta aos inibidores da angiogénese em doentes com GEP-NETs.

5 – CONCLUSÕES

Numa tentativa de procurar esclarecer a controvérsia do papel da angiogénese nos GEP-NETs decidimos avaliar, neste estudo preliminar, a relação entre angiogénese, estágio e prognóstico de GEP-NETs.

O tempo de seguimento médio na nossa série foi de 140,8 meses, mediana de 117,5 meses (extremos: 0 – 273 meses); 5/39 doentes (12,5 %) faleceram; 5 doentes (12,5 %) foram perdidos para *follow-up*; aos 10 anos de *follow-up*, mais de 80% dos doentes encontravam-se vivos.

Globalmente os resultados de sobrevida, da nossa série, confirmam que se trata de GEP-NETs bem diferenciados com crescimento indolente. Como esperado, o índice proliferativo Ki-67 observado foi baixo, quer em tumores sem metástases quer com metástases, o que pode explicar a ausência de associação estatisticamente significativa entre o índice proliferativo Ki-67 e o estágio dos GEP-NETs desta série.

No nosso estudo, e de acordo com o descrito na literatura^{41,42,43,45} não detectamos microvasos com expressão de CD105 nos tecidos não neoplásicos.

A endoglina parece estar expressa em TNEs em estádios precoces e a sua expressão parece aumentar com o aumento do estágio do TNE. De facto verificamos que a mediana da densidade microvascular determinada pela expressão de CD105 era baixa em TNEs do apêndice ileocecal em estádios precoces e era maior em TNEs do pâncreas em estádios avançados.

A associação significativa encontrada entre a densidade microvascular dos TNEs estudados com a sobrevida dos doentes parece dar relevância biológica à endoglina em GEP-NETs.

A densidade vascular, determinada pela expressão de CD31, tal como a densidade microvascular, dos tumores da nossa série associou-se significativamente ao estágio dos tumores e à sobrevida dos doentes com GEP-NETs.

O esclarecimento mais adequado desta redundância de mecanismos angiogénicos pode ajudar a explicar a controvérsia dos resultados terapêuticos descritos, designadamente em ensaios clínicos com anti-angiogénicos em GEP-NETs.

É essencial a realização de estudos com maior número de doentes e tumores, nomeadamente estudos multicêntricos, para avaliar a reproductibilidade e a importância da densidade microvascular / vascular como marcador de resposta aos inibidores da angiogénese em doentes com GEP-NETs.

6 – RESUMO

Introdução: A angiogénese desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral e progressão neoplásica numa variedade de neoplasias. Muitos ensaios pré-clínicos indicam que a inibição da angiogénese se associa a diminuição do crescimento e da metastização tumoral. O anticorpo monoclonal CD 105 (endogлина) identifica o receptor do factor transformador do crescimento β 1 (TGF- β 1), que é uma glicoproteína trans-membranar expressa nas células endoteliais da angiogénese tumoral. **Objectivos:** Estudo preliminar para procurar esclarecer a controvérsia do papel da angiogénese nos GEP-NETs. **Material e Métodos:** Foram incluídos no estudo 39 casos com GEP-NETs, submetidos a cirurgia de ressecção e/ou biópsia incisional ou excisional, seguidos e tratados no Hospital de São João do Porto desde Janeiro de 1978 até Dezembro de 2006. Foram avaliadas as seguintes características em cada caso: localização; modo de apresentação; estadiamento clínico; tipo de ressecção; dimensão; metastização ganglionar; metastização à distância; índice Ki-67; imunorreactividade para CD105; CD31 e cromogranina e sobrevida. Foi efectuado um "tissue microarray" (TMA) das áreas representativas dos tumores. Após realização do estudo imuno-histoquímico para o CD105, CD31 e Ki-67 foram seleccionadas por 2 observadores 3 áreas da neoplasia com maior número de microvasos ("hot spots") e efectuado contagens de microvasos / campo de grande ampliação (x400 - 0.15mm²). **Resultados:** Os doentes apresentavam a idade mediana de 42 anos no momento do diagnóstico (extremos etários: 8 – 81 anos de idade). 18 doentes (46,2%) eram do sexo masculino (M) e 21 (53,8%) do sexo feminino (F). A relação sexo M/F foi de 0,86. A frequência relativa por órgão foi: estômago (2,6%); duodeno (5,1%); pâncreas (15,4%); intestino delgado (10,2%); apêndice ileocecal (64,1%) e cólon (2,6%). 5,1% das neoplasias encontravam-se associadas a síndromes endócrinas de hiperfunção (1 insulinooma; 1 glucagonoma). 84,6% dos doentes apresentavam doença localizada, 10,3% doença locorregional e 5,1% metástases à distância no momento do diagnóstico. A mediana do tempo de seguimento dos 39 doentes foi de 118 meses (extremos: 0 – 273 meses). 5/39 doentes (12,5 %) morreram neste período de *follow-up*. 5 doentes (12,5 %) foram perdidos para *follow-up*. Os doentes com tumores neuroendócrinos com metastização ganglionar ou à distância apresentaram um prognóstico significativamente pior relativamente a doentes sem metastização ($p < 0,005$). Não foram verificados microvasos com expressão de CD105 nos tecidos sem neoplasia. Verificou-se diferenças significativas na densidade de microvasos, determinada pela

expressão de endogлина, relativamente ao órgão envolvido pelo TNE ($p=0,03$) e ao estadiamento do tumor ($p=0,024$). A densidade microvascular dos tumores, determinada pela expressão de endogлина, relacionou-se significativamente com a sobrevida dos doentes ($p < 0,005$). Relativamente à expressão de CD31, foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade vascular relativamente à localização ($p=0,019$) e ao estadiamento do tumor ($p=0,014$). Verificou-se também que os tumores com metastização ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade vascular relativamente aos tumores sem metástases ($p=0,01$). A avaliação da sobrevida dos doentes, tendo em consideração a densidade vascular, determinada pela expressão de CD31, revelou resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$). Foi verificada uma correlação estatisticamente significativa ($p=0,01$) entre a densidade microvascular determinada pela expressão de CD 105 e a densidade vascular determinada pelo CD 31. **Discussão e Conclusões:** Numa tentativa de procurar esclarecer a controvérsia do papel da angiogénese nos GEP-NETs avaliou-se, neste estudo preliminar, a relação entre angiogénese, estágio e prognóstico de GEP-NETs. A endogлина parece estar expressa em TNEs em estádios precoces e a sua expressão parece aumentar com o aumento do estágio do TNE. A associação significativa encontrada entre a densidade microvascular dos TNEs estudados com a sobrevida dos doentes parece realçar a relevância biológica da endogлина em GEP-NETs. A densidade vascular, determinada pela expressão de CD31, tal como a densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, dos tumores da nossa série, associou-se significativamente ao estágio do tumor e à sobrevida dos doentes com GEP-NETs. O esclarecimento mais adequado desta redundância de mecanismos angiogénicos pode ajudar a explicar a controvérsia dos resultados terapêuticos descritos, designadamente em ensaios clínicos com anti-angiogénicos em GEP-NETs. É essencial a realização de estudos com maior número de doentes e tumores, nomeadamente estudos multicêntricos, para avaliar a reproductibilidade e a importância da densidade microvascular / vascular como marcador de resposta aos inibidores da angiogénese em doentes com GEP-NETs.

7 – RESUMO *(inglês)*

Introduction: Angiogenesis has an important role in tumor growth and progression. Many pre-clinical investigations have shown that angiogenic inhibition is associated with an inhibition of tumor progression in a variety of tumors. Multi-centric studies revealed insignificant clinical and biochemical responses of advanced gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETS) to anti-angiogenic agents. The monoclonal antibody CD 105 (endoglin) identifies the transforming growth factor receptor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) which is a trans-membrane glycoprotein that is expressed on endothelial cells involved in tumor angiogenesis. **Aims:** Preliminary study to help clarify the controversial role of angiogenesis in GEP-NETS. **Patients and Methods:** 39 patients with GEP-NETS who underwent surgery or biopsy, treated and followed at Hospital de São João of Porto, from January 1978 to December 2006, were included in the study. We evaluated the following clinical and pathological variables for each tumor: localization; presentation form; staging; type of resection; size; presence of lymph node metastasis; presence of distant metastasis; proliferation index (Ki-67); immunoreactivity to CD105; CD31 and cromogranin and overall survival. A tissue microarray of tumor representative areas was made. After the immuno-histochemical assay for CD105, CD31 and Ki-67, three areas of the tumor with the largest number of micro-vessels ("*hot spots*") were chosen and the number of micro-vessels per large magnification field ($\times 400 - 0.15\text{mm}^2$) was determined. **Results:** Median age at diagnosis was 42 (extremes of age: 8 – 81 years). 18 patients (46.2%) were men (M), 21 (53.8%) were women (F). M/F ratio was 0.86. Relative frequencies, by organ, were: stomach (2.6%); duodenum (5.1%); pancreas (15.4%); small intestine (10.3%); appendix (64.1%) and colon (2.6%). 5.1% were functioning tumors (1 insulinoma; 1 glucagonoma). 84.6% of the patients had localized disease at presentation, 10.3% lymph node metastasis and 5.1% distant metastasis. Median follow-up of the 39 patients was 118 months (extremes: 0 – 273 months). 5/39 patients (12.5 %) died during this follow-up period. 5 patients (12.5 %) were lost to follow-up. Patients with GEP-NETS with lymph node or distant metastasis had a significantly worse prognosis relatively to patients without metastasis ($p < 0.005$). We didn't identify micro-vessels with CD105 expression in non-neoplastic tissue. We observed statistically significant differences in microvessel density, determined by CD105 expression, when considering the organ involved by the tumor ($p = 0.03$) and tumor stage ($p = 0.024$). Microvessel density of the tumors, determined by CD 105 expression, had a

significant impact on survival ($p < 0.005$). Vascular density, determined by CD31 expression, also demonstrated statistically significant differences when considering the organ involved by the tumor ($p = 0.02$) and tumor stage ($p = 0.014$). Tumors with lymph node metastasis and / or distant metastasis had a higher vascular density, determined by CD31 expression, when compared to localized tumors ($p = 0.01$). Vascular density of the tumors also had a significant impact on survival ($p < 0.005$). A statistically significant correlation ($p = 0.01$) between microvessel density, determined by CD105 expression, and vascular density, determined by CD 31 expression, was observed. **Discussion and Conclusions:** In order to try to help clarify the controversial role of angiogenesis in GEP-NETs we evaluated, in this preliminary study, the relationship between angiogenesis, tumor stage and prognosis of GEP-NETs. In our study, CD105 was expressed in early stages and expression seemed to increase with tumor progression. The significant association found between microvessel density and overall patient survival seems to give biological relevance to endoglin in GEP-NETs. Vascular density, determined by CD31 expression, as microvessel density, determined by CD105 expression, of the tumors of our study, had a significant association with tumor stage and patient survival. An adequate clarification of this redundancy of angiogenic mechanisms may help explain the therapeutic results published in the literature, namely the clinical trials with angiogenic inhibitors in GEP-NETs. It is essential to organize multicentric studies involving angiomics and selective microarrays, to evaluate the reproducibility of our results and the importance of microvessel / vessel density as a response marker to angiogenic inhibitors in patients with GEP-NETs.

7 – BIBLIOGRAFIA

1. Ramage J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumors. *Gut* 2005; 54: 1-16
2. Tomassetti P, Migliori M, Lalli S, et al. Epidemiology, clinical features and diagnosis of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Ann Oncol* 2001; 12 (suppl.2): S95-S99
3. Modlin et al. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97: 934-959
4. Rindi G, Kloppel G et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006; 449(4): 395-401
5. Rindi G, Kloppel G et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007; 451(4): 757-62
6. K. Öberg et al. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2010; 21: 223–227
7. Helen E et al. Angiogenesis in Endocrine Tumors. *Endocrine Reviews* 2003; 24(5):600–632
8. Wulbrand U, Feldman M, Pfestroff A et al. A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes. *Cancer* 2002; 15; 94 (4Suppl.):1293-7
9. Hofland LJ, Lamberts SWJ. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 2001; 12 (Suppl.2): S31-S36
10. Kulaksiz H, Eissele R, Rossler D et al. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3 and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut* 2002; 50(1):52-60
11. Delle G, Corleto V. Oncogenes, growth factors, receptor expression and proliferation markers in digestive neuroendocrine tumours. A critical reappraisal. *Ann Oncol* 2001; 12 (suppl.2): S13-S17
12. Starker LF, Carling T. Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Curr Opin Oncol* 2009; 21(1):29-33
13. Oberg K. Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors). *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16(1): 72-8.
14. Akerstrom G, Hellman P. Surgery on neuroendocrine tumours. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; Vol. 21, No. 1, pp. 87–109
15. Matthew H, Kulke et al. Phase II Study of Recombinant Human Endostatin in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2006; Vol 24, No 22: pp. 3555-3561

16. Matthew H. Kulke et al. Activity of Sunitinib in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3403-3410
17. Capdevila J, Salazar R. Molecular targeted therapies in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Targ Oncol* 2009; 4:287–296
18. Folkman J et al. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Câncer Biol* 1992; 3:65-71
19. Arbiser JL et al. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:861-866
20. Okada F et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3609-3614
21. Dameron KM et al. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59:483-489
22. Rodriguez-Manzaneque JC et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:12485-12490
23. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029-1039
24. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257
25. Dass CR, Su T. Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: role of vascular endothelial cells. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52:1301-1317
26. Larochelle WJ, Shimkets RA. *Oncogenomics handbook*
27. Henz HJ et al. Antiangiogenic agents in cancer therapy. *Oncology* 2005; 19:17-25
28. J Folkman et al. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-6
29. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF et al. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg* 1980; 192: 762 – 771
30. Sillman F, Buyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 154 – 159
31. Whisenant J, Bergsland E. Anti-angiogenic strategies in gastrointestinal malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 411-21.;
32. Rakesh K Jain. Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncology* 2005; 19:7-16
33. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 2005; 41:1109-1116

34. Wang JM, Kumar S, Pye D *et al.* Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:386–388
35. Fanelli M, Locopo N, Gattuso D *et al.* Assessment of tumor vascularization immunohistochemical and non-invasive methods. *Int J Biol Markers* 1999; 14:218-231
36. Mietinnen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, BNH9 antibody to H- and Y- antigens: evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol* 1994; 7:82–90
37. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI *et al.* Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinoma? *Oncol Res* 1999; 11: 205-212
38. Haggstrom S, Bergh A, Damber JE. Vascular endothelial growth factor content in metastasizing and nonmetastasizing Dunning prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2000; 45:42-50
39. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. CD105 and angiogenesis. *J Pathol* 1996; 178: 363-366
40. Kumar S, Ghellal A, Li C *et al.* Breast carcinoma: vascular density determined using CD 105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999; 178:363-366
41. Saad RS, Jasnosz KM, Silverman JF. Endoglin (CD 105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22: 248-253
42. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ *et al.* Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2000; 96:224-228
43. Saad RS, Liu YL, Nathan G *et al.* Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer development. *Mod Pathol* 2004; 17: 197-203
44. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y *et al.* Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002; 131 (1 suppl): S109-S113
45. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE *et al.* Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neovascularization. *Anticancer Res* 1998; 18:3621-3628
46. J-G Jiao *et al.* A plasmid DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces anti-tumour immune response against self-endoglin-related angiogenesis in two liver cancer models. *Dig Liver Dis* 2006; 12
47. Jie-Ge Jiao *et al.* A DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces antitumor immunity in a mouse colon carcinoma model. 2005;24:1179-83
48. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2474-2484

49. Günter K et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Towards a Standardized Approach to the Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Their Prognostic Stratification. *Neuroendocrinology* 2009; 90:162–166
50. Turkbey B, Kobayashi H et al. Imaging of Tumor Angiogenesis: Functional or Targeted? *AJR* 2009; 193:304-313
51. Josephs D, Spicer J, O'Doherty M. Molecular imaging in clinical trials. *Target Oncol* 2009; 4(3):151-68
52. Sarah E. Duff et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB Journal* 2003;17:984-992
53. Dallas NA, Samuel S et al. Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy. *Clinical Cancer Research* 2008; 14; 1931