

Artigo Original

Diagnóstico e prognóstico dos tumores pulmonares neuroendócrinos mediante microscopia eletrônica e análise multivariável de agrupamento*

Using electron microscopy and multivariate cluster analysis to determine diagnosis and prognosis in cases of neuroendocrine lung carcinoma

Cecília Aparecida Vaiano Farhat¹, Edwin Roger Parra², Andrew V. Rogers³,
Sílvia Nagib Elian⁴, Mary N. Sheppard³, Vera Luiza Capelozzi⁵

Resumo

Objetivo: Estabelecer, com ajuda do microscópio eletrônico, critérios que possibilitem uma diferenciação mais exata entre os quatro tipos maiores de tumores neuroendócrinos pulmonares: tumor carcinóide típico e atípico, carcinoma de grandes células neuroendócrino e carcinoma de pequenas células. **Métodos:** Todos os tumores foram avaliados morfometricamente e 16 variáveis foram relacionadas com diferenciação das células tumorais; estas variáveis foram analisadas sob microscopia eletrônica com ajuda de um analisador de imagem digital em 27 tumores. A avaliação através da microscopia eletrônica revelou que todos os tumores investigados podiam ser classificados a um dos quatro tipos listados acima. A análise das variáveis morfométricas foi usada para agrupar os tumores em três grandes grupos, os quais foram relacionados à sobrevivência pelas curvas de Kaplan Meier. **Resultados:** Os três grupos de carcinoma neuroendócrino associaram-se às curvas da sobrevivência, as quais mostraram características ultra-estruturais na microscopia eletrônica de significância prognóstica distinta. Os tumores foram contidos em três grupos bem definidos, que representam o espectro da diferenciação neuroendócrina: tumor carcinóide (grupo 1); tumor carcinóide atípico e carcinoma de grandes células neuroendócrino (grupo 2); e carcinoma de pequenas células (grupo 3). O grupo 2 representa um espectro intermediário na carcinogênese neuroendócrina, entre o carcinóide típico e o carcinoma de pequenas células. **Conclusões:** Nossos achados confirmam que a microscopia eletrônica é uma ferramenta útil no diagnóstico e prognóstico dos casos de tumores pulmonares.

Descritores: Tumores neuroendócrinos/pulmão; Microscopia eletrônica; Análise por aglomerados; Análise de sobrevivência.

Abstract

Objective: To establish reproducible electron microscopic criteria for identifying the four major types of neuroendocrine tumors of the lung: carcinoid; atypical carcinoid; large cell neuroendocrine carcinoma; and small cell carcinoma. **Methods:** Measurements were made on electron micrographs using a digital image analyzer. Sixteen morphometric variables related to tumor cell differentiation were assessed in 27 tumors. The examination under electron microscopy revealed that all of the tumors could be classified as belonging to one of the four categories listed above. Cluster analysis of the morphometry variables was used to group the tumors into three clusters, and Kaplan-Meier survival function curves were employed in order to draw correlations between each cluster and survival. **Results:** All three clusters of neuroendocrine carcinomas were found to be associated with survival curves, demonstrating the prognostic significance of electron microscopic features. The tumors fell into three well-defined clusters, which represent the spectrum of neuroendocrine differentiation: typical carcinoid (cluster 1); atypical carcinoid and large cell neuroendocrine carcinoma (cluster 2); and small cell carcinoma (cluster 3). Cluster 2 represents an intermediate step in neuroendocrine carcinogenesis, between typical carcinoid tumors and small cell carcinomas. **Conclusions:** Our findings confirm that electron microscopy is useful in making the diagnosis and prognosis in cases of lung tumor.

Keywords: Neuroendocrine tumors/lung; Microscopy, electron; Cluster analysis; Survival analysis.

* Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

1. Professora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.
2. Pos-Doutorando na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.
3. Professor no Departamento de Histopatologia do Royal Brompton Hospital, London, Reino Unido.
4. Professor de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.
5. Professor Associado do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Endereço para correspondência: Vera Luiza Capelozzi or Edwin Roger Parra, Departamento de Patologia Faculdade de Medicina da USP, Av. Dr. Arnaldo, 455, Sala 1143, CEP 01246-903, São Paulo (SP) Brasil.

Tel 55 11 3061-7427; Fax 55 11 3064-2744. E-mail: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br / erparra20003@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Este trabalho recebeu apoio financeiro das seguintes agências brasileiras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo 300430/95-7; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2000/14336-0; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Laboratórios de Investigação Médica (LIM) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Recebido para publicação em 14/11/2007. Aprovado, após revisão, em 30/1/2008.

Introdução

Os tumores neuroendócrinos do pulmão podem ser considerados um subconjunto distinto de tumores, pois compartilham certas características morfológicas, ultra-estruturais, imuno-histoquímicas e moleculares.⁽¹⁻⁹⁾

Sua classificação é muito importante, não apenas por fornecer a base para o tratamento do paciente, mas também por proporcionar uma base de comparação de estudos epidemiológicos e biológicos, que são úteis para entender sua etiologia.⁽¹⁰⁻¹³⁾

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS),⁽¹⁴⁾ as principais categorias dos tumores neuroendócrinos incluem carcinoma de pequenas células, carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNEGC), carcinóide típico e carcinóide atípico.

A classificação da OMS baseia-se na microscopia ótica.

Na prática, entretanto, a diferenciação entre esses tumores é normalmente feita com base nas descobertas da microscopia eletrônica, principalmente na quantificação e na qualificação de grânulos de corpo denso.⁽¹⁵⁻¹⁹⁾

Decidimos realizar um estudo ultra-estrutural dos quatro tipos de carcinoma neuroendócrino de pulmão, usando análise morfométrica e multivariada por grupos para determinar se as descobertas da microscopia ótica se correlacionam às descobertas da microscopia eletrônica na classificação desses tumores.

Se estabelecida, essa correlação nos permitirá adquirir melhor percepção do espectro morfológico dos carcinomas neuroendócrinos.

Métodos

Os espécimes foram coletados através de uma revisão retrospectiva dos prontuários médicos e patológicos de 27 tumores primários de pulmão com características neuroendócrinas, tratados cirurgicamente entre 1984 e 1992 no Royal Brompton Hospital em Londres, Inglaterra.

O tecido disponível para estudo havia sido fixado em solução de formalina 10% tamponada, incluído em parafina, seccionado e corado com hematoxilina e eosina.

Foram realizados estudos ultra-estruturais em todos os tumores.

No momento da ressecção, amostras do tumor foram sorteadas aleatoriamente, fixadas em glutaraldeído 2,5% tamponado, incluídas em Araldite e cortadas em seções finas que, por sua vez, foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Antes do estudo morfométrico, a microscopia ótica foi usada para diagnosticar o grau de diferenciação neoplásica de acordo com os critérios da OMS de 2004.⁽¹⁴⁾

Um total de 27 tumores foi selecionado para morfometria: 7 tumores carcinóides típicos; 5 tumores carcinóides atípicos; 8 CNEGCs; e 7 carcinomas de pulmão de pequenas células (CPPCs).

De cada tumor, foram obtidas micrografias eletrônicas aleatórias dos perfis celulares completos a $\times 2.500$ ou $\times 3.400$.

As fotografias foram digitalizadas e, em seguida, as células, os núcleos das células e os grânulos foram analisados pelo software de domínio público NIH Image em um computador Apple da Macintosh.

Para cada tipo de tumor, aproximadamente 50 células foram amostradas.

Os dados foram submetidos à análise de 16 variáveis por grupos para determinar, de forma reprodutível, se os tumores neuroendócrinos são classificáveis do ponto de vista estatístico e, se forem, como o são.

Neste estudo, devido às diferenças da média e da variância entre as variáveis, definimos a distância entre os elementos i th e j th de forma padronizada, como segue:

$$D(i,j) = [(x_{1i} - x_{1j})^2 / s_1^2 + (x_{2i} - x_{2j})^2 / s_2^2 + \dots + (x_{16i} - x_{16j})^2 / s_{16}^2]^{1/2}$$

onde s_1, s_2, \dots, s_{16} são as variâncias estimadas para X_1, X_2, \dots, X_{16} , respectivamente.

As distâncias entre pares de grupos ou entre um indivíduo e um grupo foram determinadas pelo método de ligação hierárquica de Ward.⁽²⁰⁾

No método de Ward, o agrupamento é realizado com o objetivo de minimizar a soma do desvio quadrado (S) em um grupo, conforme descrito na seguinte equação:

$$S = \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (x_{ji} - \bar{x}_j)^2$$

onde \bar{x} é a média, m é o número de variáveis, n é o número de indivíduos no grupo, x_{ji} é a medida da variável j th no indivíduo i th, \bar{x}_j é a média da variável j th.

Se calcularmos ΔS_{pq} , o aumento de S quando dois grupos (p e q) são ligados é o seguinte:

$$\Delta S_{pq} = S_{p+q} - S_p - S_q = \sum_{j=1}^n \{ \sum_{i=1}^n (x_{ji}^{(p+q)} - x_j^{-(p+q)})^2 - \sum_{i=1}^n (x_{ji}^{(p)} - x_j^{-(p)})^2 - \sum_{i=1}^n (x_{ji}^{(q)} - x_j^{-(q)})^2 \}$$

onde $x_j^{-(p+q)}$, $x_j^{-(p)}$ e $x_j^{-(q)}$ são os valores médios da variável j th nos grupos $p+q$, p e q , respectivamente. A expressão acima pode ser simplificada como segue:

$$\Delta S_{pq} = n_p n_q / (n_p + n_q) \sum_{j=1}^n (x_j^{-(p)} - x_j^{-(q)})^2 = n_p n_q / (n_p + n_q) D^2(p, q)$$

Portanto, no método de Ward, um grupo é formado de forma a agrupar pares de indivíduos ou grupos tendo o valor mínimo de ΔS .

Para avaliar a classificação obtida através da análise hierárquica de grupos, uma análise de sobrevivência foi realizada.

Para cada grupo, estimamos a função de sobrevivência $S(t) = P(\text{um indivíduo sobrevive mais que } t)$.

O método do produto-limite de Kaplan-Meier,⁽²¹⁻²³⁾ adequado para estimar as funções de sobrevivência em amostras pequenas com observações censuradas, foi empregado.

Esse método não requer qualquer suposição quanto à forma da função que está sendo estimada.

Todas as análises foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).⁽²⁴⁾

O limiar de significância estatística foi definido como $\alpha = 5\%$.

Resultados

Ultra-estruturalmente, em tumores carcinóides típicos, os núcleos demonstraram condensação de cromatina na periferia, próxima à membrana nuclear.

Houve grânulos caracteristicamente abundantes, densos e ligados à membrana, com heterogeneidade considerável em tamanho e configuração dentro do citoplasma da célula (Figuras 1A e 1C).

Nos tumores carcinóides atípicos, os núcleos estavam regularmente contornados e mostraram alguma condensação periférica de cromatina; nucléolos proeminentes foram raros.

O citoplasma mostrou-se abundante de processos citoplasmáticos.

Houve números moderados de grânulos de corpo denso, que estavam difusamente distribuídos por

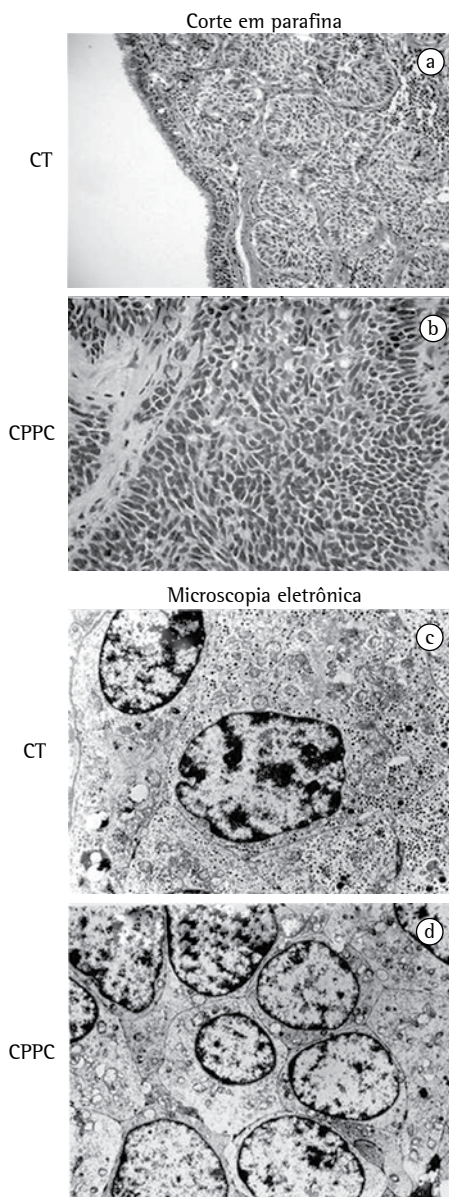


Figura 1 - Tumores diagnosticados microscopicamente como um tumor carcinóide típico (CT) e um carcinoma de pequenas células (CPPC) antes da morfometria. O tumor CT (grupo 1; Painéis A e C) demonstrou leve atipia nuclear sem mitoses. O CPPC (grupo 3; Painéis B e D) demonstrou uma atipia mais severa com pequenos núcleos hiper cromáticos e pouco citoplasma com necrose. Na microscopia eletrônica, os dois mostraram condensação da heterocromatina na periferia do núcleo, próxima à membrana nuclear. No tumor CT (Painel C), houve grânulos caracteristicamente abundantes, densos e ligados à membrana, com heterogeneidade considerável em tamanho e configuração. (A e B, microscopia ótica: H&E $\times 200$; C e D, microscopia eletrônica: $\times 6000$ e $\times 5000$, respectivamente).

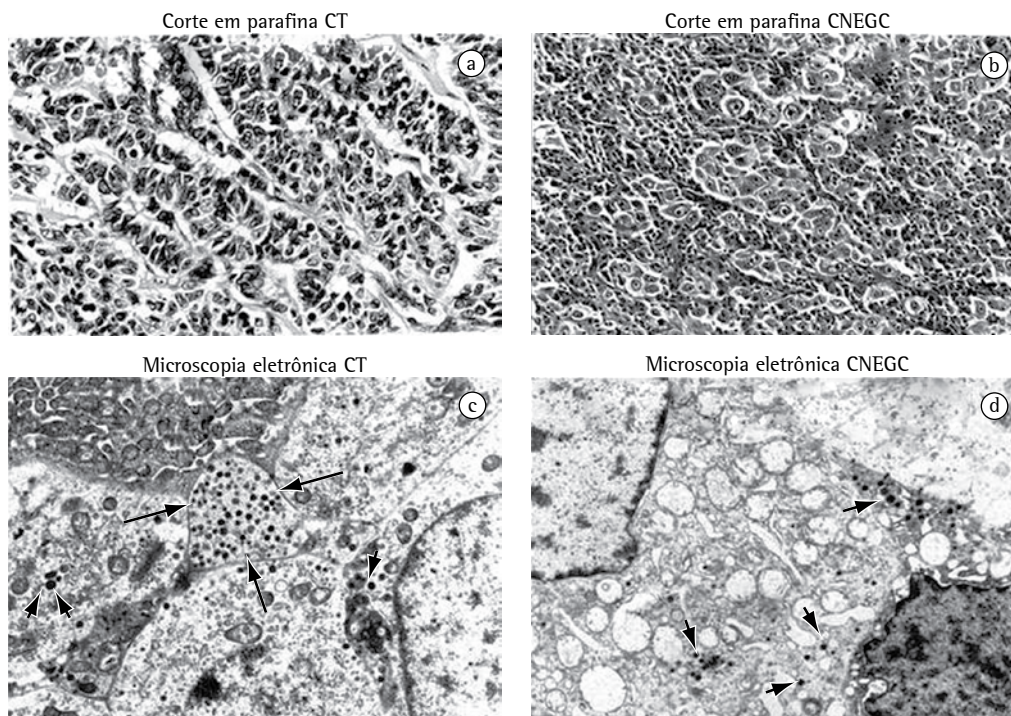


Figura 2 - Tumores diagnosticados microscopicamente como um tumor carcinóide atípico (CA) e um carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNEGC) antes da morfometria. O tumor CA, incluído no grupo 2 (Painéis A e C), mostrou atipia nuclear leve a moderada. O CNEGC, incluído no grupo 2 (Painéis B e D), mostrou atipia nuclear mais severa do que a observada no tumor descrito nos painéis A e C. Observe os grânulos (setas pequenas) distribuídos nos processos citoplasmáticos (setas) e mais numerosos no tumor CA. (A e B, microscopia ótica: H&E x200; C e D, microscopia eletrônica: x9000).

todo o citoplasma, com a tendência de se concentrar nos processos citoplasmáticos.

Os grânulos eram heterogêneos em tamanho, forma e densidade eletrônica (Figuras 2A e 2C).

Nos CNEGCs, a cromatina nuclear tendeu a ser grosseiramente densa eletronicamente, e os nucléolos eram bastante proeminentes.

Pequenos números de grânulos de corpo denso, variando significativamente em formato e tamanho, foram observados dentro do citoplasma ou nos processos citoplasmáticos (Figuras 2B e 2D).

Nos CPPCs, a relação núcleo/citoplasma foi alta, com pouco citoplasma, o núcleo mostrou cromatina finamente granular, e não houve nucléolos proeminentes (Figuras 1B e 1D).

Os grânulos de corpo denso eram poucos em número e localizados principalmente em processos celulares.

Após a morfometria, as características das células foram representadas por 16 variáveis, como mostra a Tabela 1.

A Figura 3 é um dendrograma obtido para as 16 variáveis usando a análise de grupo.

Os 27 tumores foram agrupados em 3 grupos: grupo 1, composto exclusivamente de tumores carcinóides típicos ($n = 7$); grupo 2, composto de tumores carcinóides atípicos e CNEGCs ($n = 13$); e grupo 3, composto exclusivamente de CPPCs ($n = 7$).

Os grupos 1 e 3 apresentaram uma profunda clivagem com o grupo 2, e a diferença foi altamente significativa.

Os grupos 1 e 3 foram bastante coerentes, enquanto o grupo 2 exibiu subgrupos.

O grupo 2 apresentou sobreposição próxima dos tumores carcinóides atípicos e CNEGCs.

Portanto, temos um espectro de descobertas por microscopia eletrônica variando de tumor carcinóide típico puro até CPPC puro, enquanto os tumores

Tabela 1 – Valor das variáveis nos três grupos.

Variável	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	Média (variância)	Média (variância)	Média (variância)
Área celular	108,0 (745,30)	243,50 (2601,0)	72,18 (272,91)
Relação largura/comprimento celular	1,63 (0,04)	2,45 (0,50)	1,02 (0,09)
Comprimento celular	14,60 (4,28)	24,62 (83,90)	8,18 (1,81)
Área nuclear	33,36 (8,41)	49,66 (340,77)	24,38 (83,54)
Comprimento nuclear	7,43 (0,29)	14,65 (12,96)	8,30 (0,81)
Área granular	12792 (2,4E+7)	23622 (1,8E+8)	9805 (1,5E+7)
Grânulos/citoplasma	0,90 (0,40)	0,60 (1,40)	0,10 (0,04)
Relação citoplasma/núcleo	1,37 (0,02)	2,00 (0,56)	1,40 (0,03)
Largura nuclear	5,46 (0,13)	7,69 (2,29)	6,04 (1,43)
Largura celular	8,95 (0,65)	10,57 (10,10)	8,41 (4,21)
Área citoplasmática	71,82 (59,91)	103,23 (3083)	36,41 (116,47)
Relação largura/comprimento nuclear	0,47 (0,005)	0,58 (0,08)	0,74 (0,15)
Grânulos/célula	0,87 (0,11)	0,52 (0,069)	0,042 (0,0001)
Total de grânulos	183,42 (3540)	31,54 (127,57)	5,40 (5,01)
Eixo do grânulo (menor diâmetro)	57,14 (151,53)	64,89 (297,05)	60,99 (106,05)
Diâmetro do grânulo (maior diâmetro)	115,94 (636,33)	132,56 (1738)	121,99 (424,19)

Grupo 1: tumores carcinóides típicos (n = 7); Grupo 2: tumores carcinóides atípicos e carcinomas neuroendócrinos de grandes células (n = 13); e Grupo 3: carcinomas de pulmão de pequenas células (n = 7)

carcinóides atípicos e os CNEGCs diagnosticados pela microscopia ótica recaíram no grupo de sobreposição (grupo 2).

Na Tabela 1, os valores descritivos (média e variância [V]) são apresentados para cada grupo.

No grupo 3, a área celular (C_A) e a área nuclear (N_A) foram menores (média $C_A = 72,18$, $VC_A = 272,91$; média $N_A = 24,38$, $V N_A = 83,54$), o comprimento nuclear médio (N_L) foi 8,30 ($VN_L = 0,81$), e houve poucos grânulos, a área granular média (G_A) sendo 9805 ($VG_A = 1,5 E+7$).

Os grânulos foram distribuídos primeiramente nos processos citoplasmáticos, o que é característico de carcinoma de pequenas células.

No grupo 2, houve uma combinação de grandes células e células pleomórficas (média $C_A = 243,50$, $VC_A = 2601$; comprimento celular médio [C_L] = 24,62, $VC_L = 83,90$) com núcleos irregularmente alongados e núcleos pleomórficos (média $N_A = 49,66$, $VN_A = 340,77$), contendo grânulos grandes e pleomórficos (média $G_A = 23622$, $V G_A = 1,8 E+8$), que são característicos de tumores carcinóides atípicos e carcinomas de grandes células.

O grupo 1 mostrou núcleos menores do que o grupo 2, com mais citoplasma do que no grupo 3, porém, menos do que no grupo 2.

O grupo 1 também apresentou mais grânulos do que os outros dois grupos, o que é característico de tumores carcinóides típicos.

Especial atenção é dedicada aos valores dos parâmetros dos tumores carcinóides atípicos e CNEGCs no grupo 2, que exibiu 2 subgrupos (Figura 3): subgrupo A, à esquerda, compreendendo 3 tumores carcinóides atípicos e 2 CNEGCs, com células pleomórficas maiores e mais alongadas (média $C_A = 271,5$, $VC_A = 5227,3$) do que as observadas no subgrupo B, que compreendia 2 tumores carcinóides atípicos e 6 CNEGCs (média $C_A = 226,01$, $VC_A = 559,19$) e no qual os núcleos pleomórficos eram maiores e mais irregulares (média $N_A = 53,55$, $VN_A = 491,06$).

A validade e a reprodutibilidade dos resultados foram determinadas da seguinte forma.

Inicialmente, os dados das 16 variáveis relatados para as 27 lesões foram submetidos à análise do componente principal,⁽²¹⁾ criando o 1º, 2º ... 6º componente principal $Y_1, Y_2 \dots Y_6$.

Descobrimos que, mesmo se apenas os componentes de 1 a 6 fossem levados em consideração e os demais fossem omitidos, mais de 92% das variações totais nos dados seriam salvas.

Como os coeficientes dos componentes Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5 , e Y_6 eram, respectivamente, (0,8050;

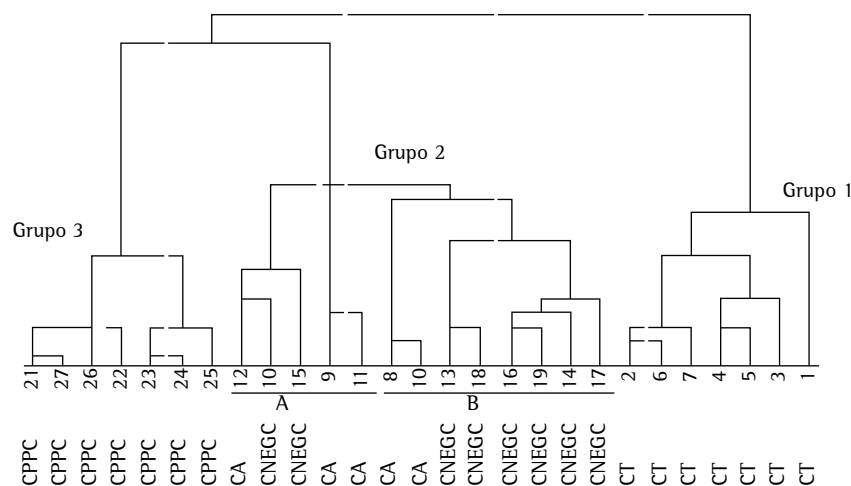


Figure 3 – Dendrograma das 27 lesões avaliadas, aqui agrupadas em três grupos. Observe que o grupo 2 é composto de dois subgrupos, A e B. Na margem inferior estão demonstrados os diagnósticos de cada uma antes da morfometria. CPPC: carcinoma de pulmão de pequenas células; CA: carcinóide atípico (tumor); CNEGC: carcinoma neuroendócrino de grandes células; e CT : carcinóide típico (tumor).

0,8240; 0,9610; 0,8070), (0,6970; 0,6930; 0,7090), (0,7630), (-0,6060; 0,7020), (-0,4930; 0,4890; 0,4800) e (-0,5280; 0,4450), eles podem ser visualizados como segue:

- y_1 (primeiro componente) coincide com as variáveis $C_A + N_A + \text{grânulos/citoplasma } (G_{Cy}) + \text{largura nuclear } (N_w)$, referidas, coletivamente, como *fator de tamanho celular*
- y_2 (segundo componente) coincide com as variáveis relação largura/comprimento nuclear (N_R) + eixo granular (G_{Ax}) + diâmetro granular (G_D), referidas, coletivamente, como *fator de tamanho nuclear e granular*
- y_3 (terceiro componente) coincide com grânulos/célula (G_c), referido como *fator de densidade granular*
- y_4 (quarto componente) coincide com as variáveis área granular (G_A) + (C_L), referidas, juntamente, como *fator de tamanho grânulo por comprimento celular*
- y_5 (quinto componente) coincide com as variáveis relação largura/comprimento celular (C_R) + relação citoplasma/núcleo (Cy_R) + largura celular (C_w) + $N_R + G_{Ax} + G_D$, referidas, coletivamente, como *fator de relação núcleo por citoplasma*
- y_6 (sexto componente) coincide com as variáveis $G_A + \text{grânulos totais } (TG)$, referidas, juntamente, como *fator de relação célula por grânulo*

Na análise de grupo 16-dimensional, não é possível visualizar como as lesões individuais estão distribuídas no espaço 16-dimensional.

Portanto, introduzimos a análise discriminante canônica (análise discriminante de Fisher)⁽²¹⁾ para visualizar em que extensão as lesões se sobrepõem ou formam grupos separados.

Essa análise também cria um conjunto de equações discriminantes lineares de um dado conjunto de dados, de forma a maximizar a diferença entre os grupos.

Assim, as fórmulas discriminantes lineares d_1 , d_2 , e d_3 , respectivamente, são individualmente expressas como uma fórmula linear incluindo os componentes principais $y_1, y_2 \dots y_6$:

$$\begin{aligned} \bullet d_1 &= -10,185 - 5,68 y_1 + 5,30 y_2 + 8,55 y_3 - 1,17 y_4 + 2,16 y_5 + 0,0055 y_6 \\ \bullet d_2 &= -5,331 + 7,77 y_1 - 2,27 y_2 - 2,06 y_3 + 0,52 y_4 + 2,41 y_5 - 1,04 y_6 \\ \bullet d_3 &= -10,462 - 8,75 y_1 - 1,08 y_2 - 4,71 y_3 + 0,21 y_4 - 6,64 y_5 + 1,92 y_6 \end{aligned}$$

Das variáveis canônicas obtidas, a 1ª e a 2ª variável, d_1 e d_2 , foram calculadas para cada indivíduo.

Isso permite visualizar em um gráfico de coordenadas cartesianas d_1, d_2 bidimensional em que extensão os indivíduos estão separados em um dado grupo.

Usando essas variáveis, um segundo teste de discriminação foi realizado para cada uma das 27 lesões.

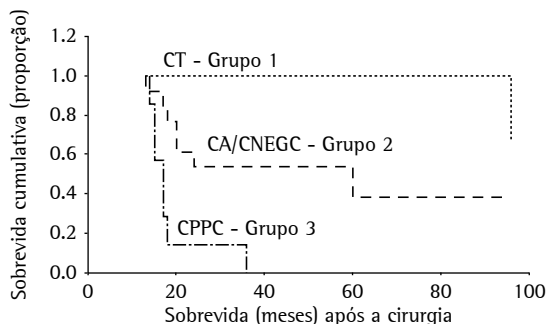


Figura 4 - Curvas de sobrevivência de pacientes estratificadas por grupo: grupo 1, tumores carcinóides típicos (CT); grupo 2, tumores carcinóides atípicos (CA) e carcinomas neuroendócrinos de grandes células (CNEGCs); e grupo 3, carcinomas de pulmão de pequenas células (CPPCs).

As curvas de sobrevivência estimadas estão plotadas na Figura 4.

A sobrevivência mediana dos pacientes com tumores do grupo 2 foi de 48 meses, o que foi muito pior do que a dos pacientes com tumores do grupo 1, mas melhor do que a dos pacientes com tumores do grupo 3.

O teste log-rank forneceu fortes evidências de uma diferença entre as curvas de sobrevivência ($p = 0,0001$).

Várias comparações das curvas revelaram diferenças significativas entre cada par de grupos.

Os pacientes com CPPCs apresentaram a mais curta sobrevivência estimada, e os pacientes com tumores carcinóides típicos, a mais longa.

Discussão

Os tumores neuroendócrinos de pulmão abrangem um espectro desde baixo grau (tumores carcinóides típicos) até grau intermediário (tumores carcinóides atípicos) e alto grau (CNEGCs e CPPCs).

Apenas recentemente o CNEGC foi reconhecido como a quarta categoria de tumores neuroendócrinos de pulmão.

Neste estudo, o exame de 27 tumores neuroendócrinos de pulmão com microscopia ótica resultou em sua subclassificação nesses quatro grupos principais, que demonstraram ter significância prognóstica.

A incidência de tumores neuroendócrinos em todo o corpo está aumentando.⁽²⁵⁾

Há controvérsias quanto ao fato de o exame com microscopia ótica ser a melhor forma de distinguir entre os diferentes tipos de tumores neuroendócrinos de pulmão, especialmente entre CNEGCs e CPPCs, e entre CNEGCs e carcinomas indiferenciados.⁽²⁶⁾

Nós aplicamos técnicas de morfometria e análise multivariada com 16 parâmetros de microscopia eletrônica nos 27 tumores neuroendócrinos de pulmão avaliados, o que resultou na formação de 3 grupos, tendo cada um deles significância prognóstica.

Isso amplia o trabalho realizado anteriormente usando microscopia ótica e confirma que os recursos da microscopia eletrônica têm significância prognóstica em tumores neuroendócrinos de pulmão.

Já foi demonstrada anteriormente a utilidade da microscopia eletrônica no diagnóstico de CNEGCs e CPPCs.^(4,15-19)

Neste estudo, os tumores recaíram em 3 grupos bem definidos que representam um espectro de diferenciação neuroendócrina em tumores de pulmão, conforme analisado pela microscopia eletrônica.

O grupo 2 apresentou uma mistura de tumores carcinóides atípicos e CNEGCs, representando uma gama intermediária entre tumores carcinóides típicos e CPPCs.

As descobertas da microscopia eletrônica indicam que as características nucleares, citoplasmáticas e granulares podem claramente se diferenciar entre tumores carcinóides típicos e CPPCs, mas não podem se diferenciar entre tumores carcinóides atípicos e CNEGCs, nos quais há sobreposição de características nucleares, citoplasmáticas e granulares no nível da microscopia eletrônica.

As características nucleares e mitoses vistas na microscopia ótica continuam sendo os critérios mais importantes para distinguir esses quatro tipos de tumor.⁽²⁷⁾

Nossas descobertas confirmam que a microscopia eletrônica é útil na classificação de tumores de pulmão, como foi demonstrado anteriormente.⁽²⁸⁾

Nossos resultados também confirmam o espectro morfológico, nos níveis da microscopia ótica e eletrônica, em tumores neuroendócrinos do pulmão.

Nós demonstramos que o uso da microscopia eletrônica pode ter uma significância prognóstica importante.

Neste estudo, a microscopia eletrônica identificou uma sobreposição entre tumores carcinóides atípicos e CNEGCs, o que espelha a sobreposição encontrada na microscopia ótica.⁽²⁹⁾

As características clínicas e os tratamentos ideais para pacientes com CNEGCs ou tumores carcinóides atípicos ainda precisam ser bem definidos.

Acredita-se que o prognóstico de CNEGCs seja mais pobre do que o de outros cânceres de pulmão não-pequenas células.⁽³⁰⁾

São necessários mais estudos, a fim de olhar mais de perto a sobreposição entre tumores carcinóides atípicos e CNEGCs, bem como o acúmulo de dados clínicos e patológicos.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao pessoal do Serviço de Documentação Científica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e também ao pessoal do Departamento de Histopatologia do Royal Brompton Hospital por sua colaboração na realização deste estudo.

Referências

1. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest.* 1983;49(5):519-37.
2. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science.* 1983;222(4625):771-8.
3. Warren WH, Gould VE, Faber LP, Kittle CF, Memoli VA. Neuroendocrine neoplasms of the bronchopulmonary tract. A classification of the spectrum of carcinoid to small cell carcinoma and intervening variants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;89(6):819-25.
4. Saldiva PH, Capelozzi VL, Battlehner CN. Neuroendocrine tumors of the lung. Corrin B, editors. In: *Pathology of lung tumors.* New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 55-69.
5. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, Hitchcock CL, Cutler GB Jr, Nieman L, et al. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. *Am J Surg Pathol.* 1991;15(6):529-53.
6. Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathol Annu.* 1983;18(Pt 1):287-330.
7. Warren WH, Memoli VA, Gould VE. Immunohistochemical and ultrastructural analysis of bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. I. Carcinoids. *Ultrastruct Pathol.* 1984;6(1):15-27.
8. Warren WH, Memoli VA, Gould VE. Immunohistochemical and ultrastructural analysis of bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. II. Well-differentiated neuroendocrine carcinomas. *Ultrastruct Pathol.* 1984;7(2-3):185-99.
9. Warren WH, Memoli VA, Gould VE. Well differentiated and small cell neuroendocrine carcinomas of the lung. Two related but distinct clinicopathologic entities. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;55(5):299-310.
10. Sheppard MN. Neuroendocrine differentiation in lung tumours. *Thorax.* 1991;46(11):843-50.
11. Valli M, Fabris GA, Dewar A, Hornall D, Sheppard MN. Atypical carcinoid tumour of the lung: a study of 33 cases with prognostic features. *Histopathology.* 1994;24(4):363-9.
12. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1972;64(3):413-21.
13. Paladugu RR, Benfield JR, Pak HY, Ross RK, Teplitz RL. Bronchopulmonary Kulchitzky cell carcinomas. A new classification scheme for typical and atypical carcinoids. *Cancer.* 1985;55(6):1303-11.
14. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* IARC Press: Lyon, 2004.
15. Delmonte VC, Alberti O, Saldiva PH. Large cell carcinoma of the lung. Ultrastructural and immunohistochemical features. *Chest.* 1986;90(4):524-7.
16. Battlehner CN, Saldiva PH, Carvalho CR, Takagaki TY, Montes GS, Younes RN, et al. Nuclear/cytoplasmic ratio correlates strongly with survival in non-disseminated neuroendocrine carcinoma of the lung. *Histopathology.* 1993;22(1):31-4.
17. Capelozzi VL, Battlehner CN, Montes GS, Saldiva PH. Volume fraction of dense-core granules correlates strongly with survival in disseminated (stage IV) neuroendocrine cell carcinomas of the lung of the well differentiated and small cell subtypes. *Pathol Res Pract.* 1993;189(10):1145-8.
18. Bernardi Fdel C, Capelozzi VL, Takagaki TY, Younes RN, Saldiva PH. Usefulness of morphometric evaluation of histopathologic slides in predicting long-term outcome of patients with squamous cell carcinoma of the lung. A preliminary report. *Chest.* 1995;107(3):614-20.
19. Carvalho HA, Saldiva PH, Takagaki TY, Capelozzi VL. Stereological estimates of the nuclear/cytoplasmic ratio and star volume on fiberoptic biopsies are of prognostic value for survival in a preliminary study of advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathology.* 1997;31(5):420-9.
20. Ward JH Jr. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc* 1963;58:236-44.
21. Johnson RA, Wichern DW, editors. *Applied multivariate statistical analysis.* Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992.
22. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53: 457-465.
23. Lee T, Wang JW. *Statistical methods for survival data analysis.* New Jersey: John Wiley & Sons.
24. SPSS Base System. *Syntax Reference Guide.* Release 6.0. SPSS. In: Chicago, Illinois, 1993.
25. Taal BG, Visser O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology.* 2004;80(Suppl 1):3-7.
26. Younossian AB, Bründler MA, Tötsch M. Feasibility of the new WHO classification of pulmonary neuroendocrine tumours. *Swiss Med Wkly.* 2002;132(37-38):535-40.
27. Beasley MB, Thunnissen FB, Brambilla E, Hasleton P, Steele R, Hammar SP, et al. Pulmonary atypical carcinoid: predictors of survival in 106 cases. *Hum Pathol.* 2000;31(10):1255-65.
28. Herrera GA, Alexander CB, Jones JM. Ultrastructural characterization of pulmonary neoplasms. I. The role of electron microscopy in characterization of the most common epithelial neoplasms. *Surv Synth Pathol Res.* 1984;3(6):520-46.
29. Herrera GA, Alexander CB, Jones JM. Ultrastructural characterization of pulmonary neoplasms. *Surv Synth Pathol Res.* 1984;3(6):520-46.
30. Takei H, Asamura H. Neuroendocrine tumors of the lung [Article in Japanese]. *Nippon Rinsho.* 2004;62(5):877-82.