

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

Microvessel Density and Prognosis of Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors

Carlos Soares¹, Herberto Bettencourt², John Preto³, Paula Soares⁴, J. Pinto-de-Sousa⁵, A. Taveira Gomes⁶, J. Costa Maia⁷, José Manuel Lopes⁸

¹ Interno Complementar de Cirurgia Geral do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital de São João do Porto, EPE. (H.S.J.); Assistente Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP);

² Interno Complementar de Anatomia Patológica do Serviço de Anatomia Patológica do H.S.J.;

³ Assistente Hospitalar do Serviço de Cirurgia Geral do H.S.J.; Assistente Convidado da FMUP;

⁴ Professora Associada da FMUP; Investigadora Sênior do Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP);

⁵ Assistente Hospitalar Graduado do Serviço de Cirurgia Geral do H.S.J.; Professor Associado Convidado com Agregação da FMUP;

⁶ Assistente Hospitalar Graduado do Serviço de Cirurgia Geral do H.S.J.; Professor Associado Convidado da FMUP;

⁷ Chefe de Serviço / Director de Serviço do Serviço de Cirurgia Geral do H.S.J.; Assistente Convidado da FMUP;

⁸ Chefe de Serviço de Anatomia Patológica do H.S.J.; Professor Associado de Anatomia Patológica da FMUP; Investigador Sênior do IPATIMUP.

Correspondência: Carlos Alberto Sousa Soares · Rua Nova da Telheira nº 321, 1º dto · 4780-510 SANTO TIRESO · carlosssoares@sapo.pt

Aceitação: Artigo recebido em 26/11/2010, revisto em 04/12/2010 e aceite para publicação em 20/12/2010.

RESUMO

Introdução: A angiogénese desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral e progressão neoplásica. A inibição da angiogénese associa-se a diminuição do crescimento e da metastização tumoral numa variedade de neoplasias. O anticorpo monoclonal CD105 (endoglina) identifica o receptor do factor transformador do crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), que é expresso nas células endoteliais da angiogénese tumoral. **Material e Métodos:** Foram incluídos no estudo 39 casos com GEP-NETS, submetidos a cirurgia de ressecção e/ou biópsia, seguidos e tratados no Hospital de São João do Porto, EPE. (H.S.J.), 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 e CD31 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 e 21 (53,8%) do sexo feminino. 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%). 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). 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.

Verificaram-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, correlacionou-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 ($p<0,005$). *Discussão e Conclusões:* 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.

PALAVRAS-CHAVE

Tumores neuro-endócrinos gastro-entero-pancreáticos; Angiogénese; Densidade microvascular; CD 105; Endogлина; CD31.

ABSTRACT

Introduction: Angiogenesis has an important role in tumor growth and metastasis and angiogenic inhibition is associated with an inhibition of tumor progression in a variety of tumors. The role of anti-angiogenic agents in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) remains to be established. The monoclonal antibody CD105 (endoglin) identifies the transforming growth factor receptor $\beta 1$ (TGF β -1) which is expressed on endothelial cells involved in tumor angiogenesis. Patients and Methods: 39 patients with GEP-NETs who underwent surgery or biopsy, treated and followed at Hospital de São João do Porto, EPE. (H.S.J.), 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; stage; type of resection; size; presence of lymph node metastasis; presence of distant metastasis; proliferation index (Ki-67); immunoreactivity to CD105 and CD31 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, 21 (53.8%) were women. 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%). 84.6% of the patients had localized disease at presentation, 10.3% lymph node metastasis and 5.1% distant metastasis. Median follow-up was 118 months (extremes: 0 – 273 months). 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 CD105 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 ($p < 0.005$). Discussion and Conclusions: 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.

KEYWORDS

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs); Angiogenesis; Microvessel density; CD105; Endoglin; CD31.

INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos gastroentero-pancreáticos (GEP-NETs) constituem aproximadamente 2% das neoplasias do sistema gastro-intestinal¹. A raridade dos GEP-NETs dificulta o seu diagnóstico e o estabelecimento de estratégias terapêuticas adequadas.

Classicamente, os tumores neuroendócrinos do tubo digestivo eram designados como *carcinóides*, com exceção 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 adequados². Em 2000 e 2004, 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^{3,4}. 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.

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^{5,6,7}.

A única forma de tratamento potencialmente curativa, continua a ser a cirurgia com remoção completa dos tumores localizados e loco-regionais^{2,8}.

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^{9,10,11}. Outras formas de tratamento médico incluem a terapêutica biológica com interferão alfa e a quimioterapia⁸. A natureza altamente vascular dos TNEs motivou um interesse na inibição angiogénica como opção terapêutica³.

A angiogénese providencia o fornecimento de oxigénio e nutrientes adaptados às alterações metabólicas dos tecidos. A angiogénese disfuncional está na origem de muitas entidades nosológicas¹².

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)^{13,14,15,16}.

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 e dificultam a acção de alguns fármacos anti-tumorais^{17,18,19}.

As células endoteliais das neoplasias expressam com elevada frequência algumas moléculas de superfície, nomeadamente integrinas, E-selectina, endogлина, endosialina e receptores do VEGF que podem ser alvo de terapêuticas biológicas dirigidas²⁰.

“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 neoplásica²¹. 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 oxigénio”²². 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^{23,24}. Poucos estudos têm avaliado a implicação clínica da angiogénese tumoral nos 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 interessantes²⁵.

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 tumoral²⁶. 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^{19,27}. 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.

Vários ensaios clínicos estão a decorrer com inibidores da angiogénese em GEP-NETs com resultados controversos^{8,28,29,30}. 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 hipóxia promove o crescimento tumoral induzindo a activação transcricional do proto-oncogene met. Este estudo fornece evidência de um segundo tipo de resposta celular à hipóxia, 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.

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^{31,32}.

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^{33,34}. No entanto, a expressão de CD 31 pode não ser detectada em neovasos intra-tumorais, como descrito por Giatromanolaki *et al*³⁴.

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^{32,35}.

O anticorpo monoclonal CD 105 (endogлина), 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 normais³⁶. Múltiplos estudos têm demonstrado que a endogлина é um marcador mais específico e sensível da angiogénese quando comparado com outros anticorpos endoteliais^{37,38,39,40,41,42}.

Há evidências que sugerem que a endogлина 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^{43,44}. Não existem estudos publicados sobre o papel da endoglina, como marcador da densidade microvascular, como factor prognóstico ou biomarcador terapêutico nos GEP-NETs.

OBJECTIVOS

O principal objectivo deste estudo preliminar consistiu na avaliação da relação entre a densidade de microvasos determinada pela endoglina (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 endoglina (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.

MATERIAL E MÉTODOS

SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CASOS

A selecção dos doentes com GEP-NETs, seguidos e tratados no H.S.J., 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.

AValiação Patológica

Foi reavaliado todo o material disponível em arquivo no Serviço de Anatomia Patológica do H.S.J., com estudo histológico de cortes de 4µ corados com Hematoxilina-Eosina. O estadiamento dos casos foi efectuado de acordo com a proposta de estadiamento TNM da ENETS^{3,4}.

Para a avaliação das amostras dos 39 casos seleccionados foi efectuado 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.

ANTICORPOS

Ver Quadro I.

QUADRO I: Marcadores utilizados no estudo e origem destes

| ANTICORPO/CLONE | ORIGEM |
|-------------------------------|-----------------------|
| CD 105 - Monoclonal Mouse | DakoCytomation, |
| Anti-Human CD 105, Clone SN6h | Inc; Carpinteria |
| CD 31 | Novocastra |
| Ki-67 | Clone SP6; Neomarkers |

IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação da expressão de endoglina

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™)® 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 DakoReal™ EnVision™ 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™)® 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 (sincício-trofoblasto), para o anticorpo CD 105, e amostras de apêndice ileo-cecal, antro gástrico e íleon, para o anticorpo CD 31.

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 vascular⁴⁵. 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 reavaliados para estabelecer consenso final.

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™. Utilizaram-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 sobrevividas, 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.

RESULTADOS

CASUÍSTICA

A série original deste estudo consistia em 145 doentes com GEP-NETs bem diferencia-

dos, 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 sobrevida 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*).

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.

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%).

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%).

Relativamente à funcionalidade, 5,1% das neoplasias apresentavam-se com 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.

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 I apresenta a curva de sobrevida dos casos.

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 II.

GRÁFICO I: Curva de sobrevida dos doentes com GEP-NETS

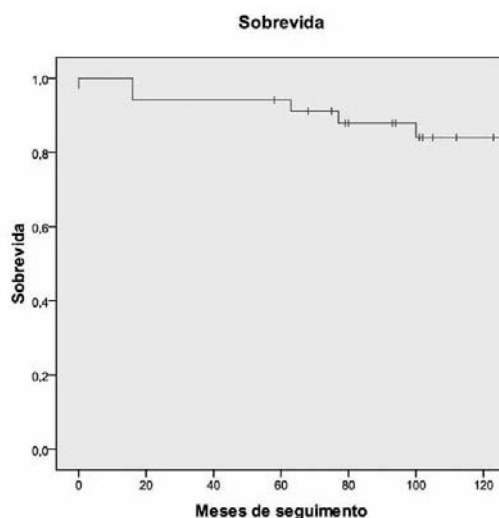
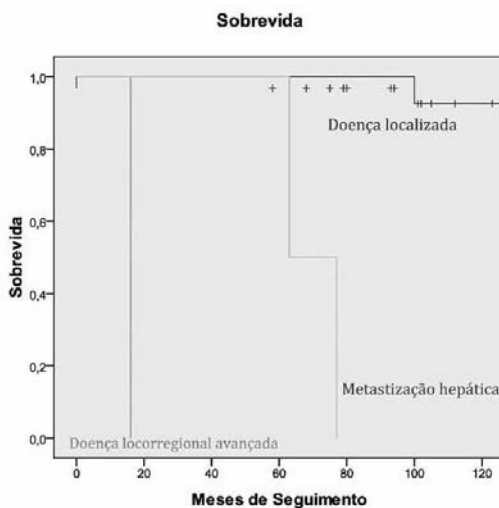


GRÁFICO II: Curvas de sobrevida dos doentes com GEP-NETS: com doença localizada, com metastização ganglionar e com metastização à distância



CD105

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).

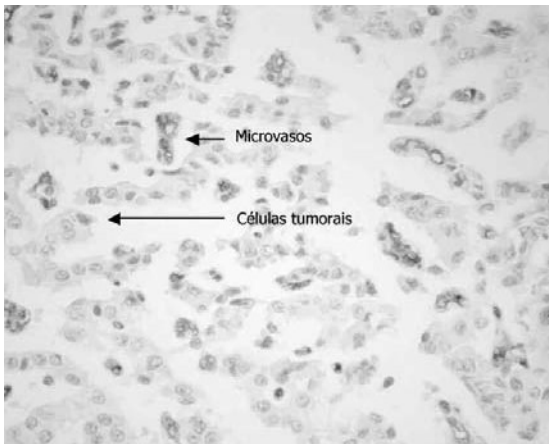
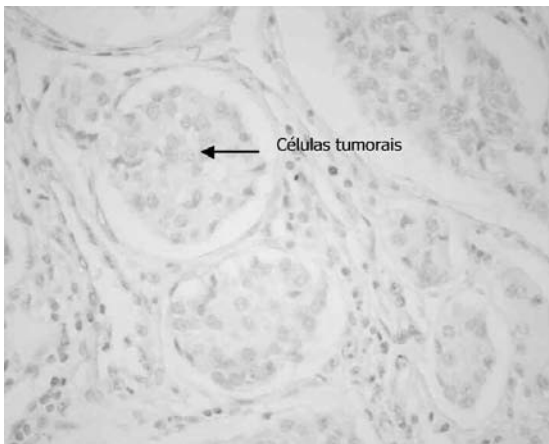


FIGURA 2: Ausência de expressão de CD105 num tumor neuroendócrino (x400 - 0.15mm2).

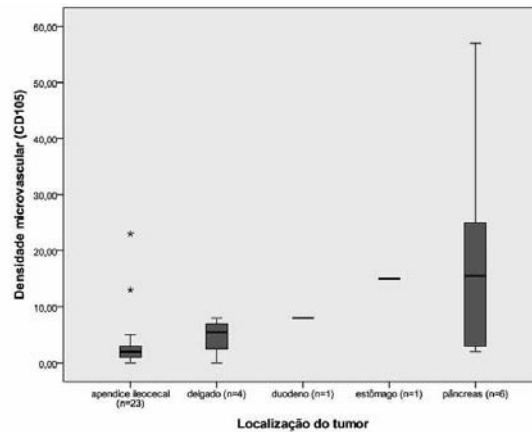


A expressão de CD105 foi observada em tumores com doença locorregional avançada, com metastização à distância e com estadiamento clínico-patológico menos avançado (T1N0M0).

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

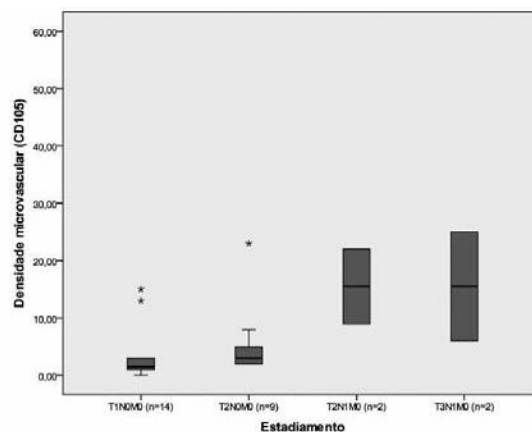
Como se pode verificar pelo Gráfico III, a expressão de CD105 relacionou-se com o órgão envolvido ($p=0,03$), sendo os tumores do apêndice ileocecal os com menor densidade microvascular e os tumores endócrinos do pâncreas os com maior densidade microvascular.

GRÁFICO III: 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 ($p=0,024$; Gráfico IV). Foram excluídos desta análise os tumores TxNOM0 (7 casos).

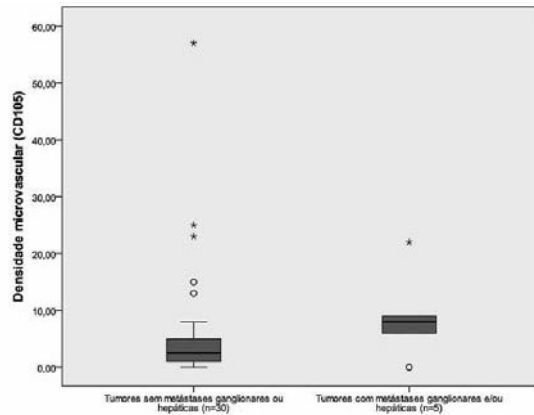
GRÁFICO IV: Densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, do TNE, em função do estadiamento do tumor.



Os tumores com metastização ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade microvascular do que os tumores

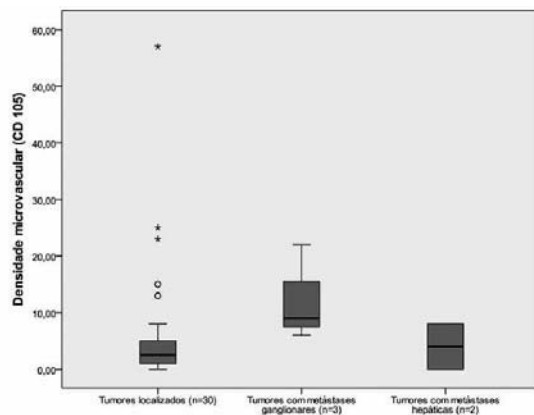
não metastizados, mas sem significado estatístico ($p=0,087$; Gráfico V).

GRÁFICO V: 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, locorreionais (com metastização ganglionar) e metastizados (com metastização à distância, nomeadamente hepática) verificou-se que não havia diferenças com significado estatístico ($p=0,143$; Gráfico VI).

GRÁFICO VI: Densidade microvascular do TNE, determinada pela expressão de CD105, em função do tipo de apresentação.



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

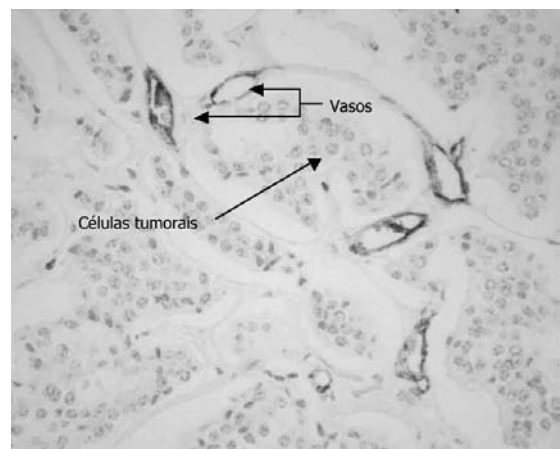
Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade microvascular, determinado pela expressão de

CD105, relativamente ao sexo nem com a presença ou ausência de síndrome de hiperfunção hormonal.

CD31

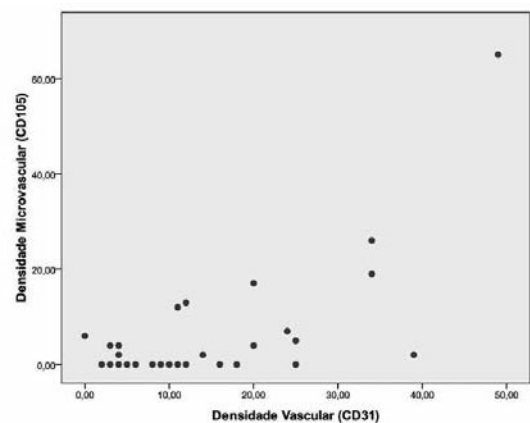
Foram observados vasos com expressão de CD31 nos tecidos neoplásicos (Figura 3) e não neoplásicos. A mediana da densidade vascular dos TNEs desta série, determinada pela expressão de CD31, foi de 13,0 /cga.

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



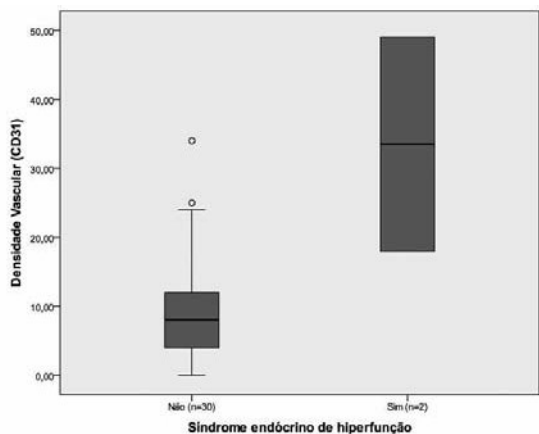
Foi verificada correlação significativa ($p = 0,01$; coeficiente de correlação de Pearson = 0,721) entre a densidade microvascular determinada pela expressão de CD105 e a densidade vascular determinada pelo CD31 – Gráfico VII.

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



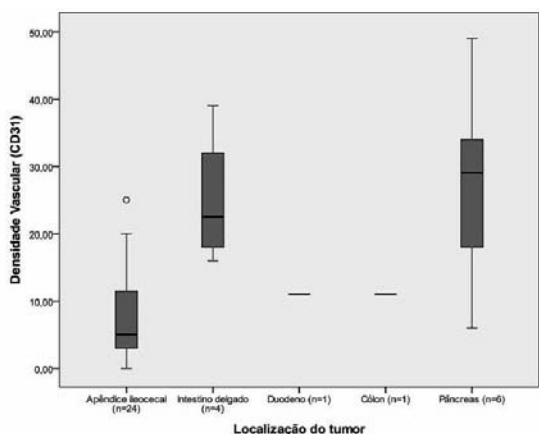
Dois tumores endócrinos pancreáticos associados a síndromes endócrinas de hiperfunção (insulinoma e glucagonoma) apresentavam maior número de vasos com expressão de CD31, embora sem significado estatístico, do que os tumores sem síndromes de hiperfunção ($p=0,053$; Gráfico VIII).

GRÁFICO VIII: Distribuição da densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, de acordo com a presença/ausência de síndrome endócrina de hiperfunção.



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

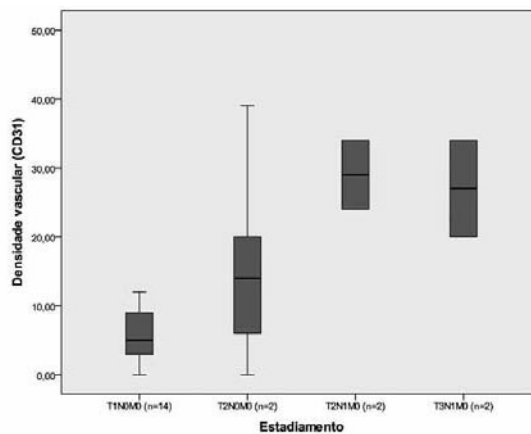
GRÁFICO IX: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função do órgão envolvido pelo tumor.



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 rela-

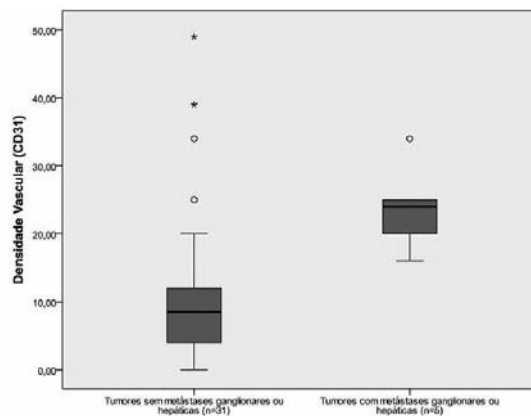
tivamente a tumores com estágio inferior ($p=0,014$; Gráfico X). Foram excluídos da análise estatística os tumores TxNOM0.

GRÁFICO X: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função do estadiamento do tumor. Foram excluídos do Gráfico os estádios com menos do que 2 casos.



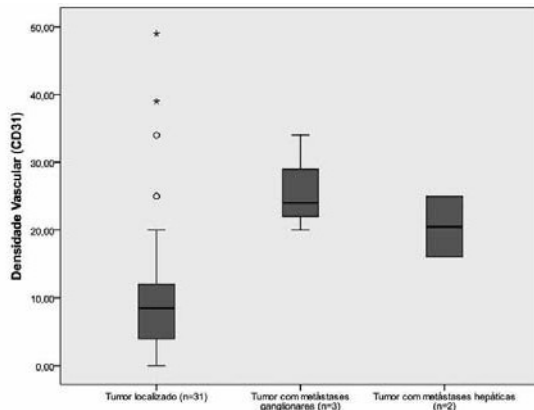
Verificou-se que os tumores com metástase ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade vascular do que os tumores sem metástases ($p=0,01$; Gráfico XI).

GRÁFICO XI: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função da presença/ausência de metástase ganglionar e/ou à distância, no momento do diagnóstico.



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

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



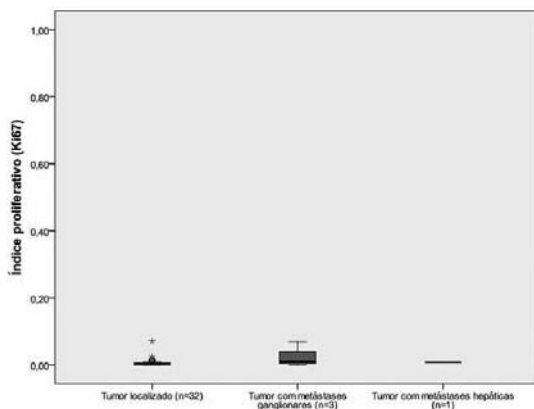
A avaliação da sobrevivência dos doentes, tendo em consideração a densidade vascular determinada pela expressão de CD31, revelou diferenças significativas ($p < 0,005$ - análise univariada). Não foi efectuada análise multivariada devido ao pequeno número de casos.

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

Ki-67

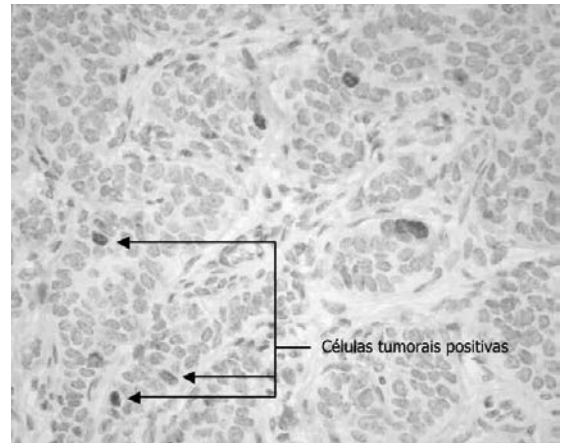
Como se pode verificar pelo Gráfico XIII, todos os tumores apresentavam um baixo índice proliferativo, incluindo os com metastização ganglionar e à distância (valor médio $< 1\%$; mediana $< 1\%$; varia-

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



ção: 0 - 7%). Na Figura 4 apresenta-se um TNE com expressão de Ki-67.

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



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.

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 noutro 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 III e IX).

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%).

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 hemicolecotomia direita.

Não foram verificadas diferenças com 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 ($p=0,057$).

Num doente, o tumor foi diagnosticado em peça de proctocolecotomia 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.

DISCUSSÃO

Os GEP-NETs são tumores raros constituindo aproximadamente 2 % das neoplasias do sistema gastro-intestinal¹.

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^{3,4}. 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%)^{1,46}.

Relativamente à nossa amostra, refletindo 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 neuroendócrinos 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 metastizados⁴⁶. 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. 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 décadas⁴⁶. Actualmente, a panóplia de tratamentos inclui: cirurgia, terapêutica biológica com análogos da somatostatina e/ou interferão alfa, terapêuticas ablativas das metástases hepáticas, análogos da somatostatina associados a radioisótopos e a quimioterapia^{2,8,47}. 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 à terapêutica das neoplasias^{48,49}.

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^{32,33,34,35}. De modo a avaliar a relação entre a angiogénese, o

prognóstico e estadiamento, utilizou-se um marcador pan-endotelial, o CD31, e o anti-corpo monoclonal CD105 (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^{50,51}.

No nosso estudo, e de acordo com o descrito na literatura^{38,39,40,42} 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 estádio 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 associava significativamente ao estádio 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, que os outros GEP-NETs não funcionantes.

Os resultados da avaliação da angiogénese nesta série permitem 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 angiômica e de microarrays selectivos específicos por tipo neoplásico e/ou estádio 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. 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 agentes citotóxicos.

CONCLUSÕES

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

Globalmente os resultados de sobrevida, da nossa série, confirmam que se trata de GEP-NETs bem diferenciados com crescimento indolente. 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 estádio dos GEP-NETs desta série.

No nosso estudo, e de acordo com o descrito na literatura^{38,39,40,42} não detectamos microvasos com expressão de CD105 nos tecidos não neoplásicos.

A endogлина parece estar expressa em TNEs em estádios precoces e a sua expressão parece aumentar com o aumento do estádio 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 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 estádio 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Tomassetti P, Migliori M, Lalli S, et al.: Epidemiology, clinical features and diagnosis of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Ann Oncol* 12 (suppl.2): S95-S99, 2001.;
2. Ramage J. K., et al; Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumors; *Gut* 2005; 54; 1-16.;
3. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006 Oct;449(4):395-401.;
4. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007 Oct;451(4):757-62.;
5. Starker LF, Carling T.; Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.; *Curr Opin Oncol.* 2009 Jan;21(1):29-33.;
6. Oberg K.; Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.); *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 Feb;16(1):72-8.;
7. Goran Akerstrom; Per Hellman.; Surgery on neuroendocrine tumours.; *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 21, No. 1, pp. 87–109, 2007).;
8. K. Öberg et al; Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.; *Annals of Oncology* 21: v223–v227, 2010.;
9. Wulbrand U, Feldman M, Pfestroff A et al.: A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes. *Cancer* 2002 Feb 15;94 (4Suppl.):1293-7.;
10. Hofland LJ, Lamberts SWJ: Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 12 (Suppl.2): S31-S36, 2001.;
11. 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 Jan;50(1):52-60.;
12. Folkman J et al. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Câncer Biol* 1992 3:65-71.;
13. Arbiser JL, et al.; Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:861-866.;
14. 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.;
15. 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.;
16. 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.;
17. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, e tal. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029-1039.;
18. Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.;
19. Dass CR, Su T (2000). Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: role of vascular endothelial cells. *J Pharm Pharmacol* 52:1301-1317.;
20. William J. Larochelle, Richard A. Shimkets.; *Oncogenomics handbook.*;
21. Heinz-Josef Lenz et al; Antiangiogenic agents in cancer therapy; *Oncology (Williston Park).* 2005 Apr;19:17-25.;
22. J Folkman et al.; *N Engl J Med*, 1971; 285: 1182-6.;
23. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, e tal. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg.* 1980; 192: 762 – 771.;
24. Sillman F, Buyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 139: 154 – 159.;
25. Jonathan Whisenant, Emily Bergsland.; Antiangiogenic strategies in gastrointestinal malignancies; *Curr Treat Options Oncol.* 2005 ep;6:411-21.;

26. Rakesh K Jain.; Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts; *Oncology (Williston Park)*. 2005 Apr ;19:7-16.;
27. Fayette J, Soria JC, Armand JP (2005). Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 41:1109-1116.;
28. Matthew H. Kulke et al.; Phase II Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors.; *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24, No 22 (August 1), 2006: pp. 3555-3561.;
29. Matthew H. Kulke et al.; Activity of Sunitinib in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors.; *J Clin Oncol* 2008 26:3403-3410.;
30. Jaume Capdevila.; Ramon Salazar.; Molecular targeted therapies in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.; *Targ Oncol* (2009) 4:287-296.;
31. 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.;
32. Fanelli M, Locopo N, Gattuso D, e tal. Assessment of tumor vascularization imunohistochemical and non-invasive methods. *Int J Biol Markers*. 1999; 14:218-231.;
33. 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.;
34. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, e tal. Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinoma ? *Oncol Res*. 1999; 11: 205-212.;
35. Haggstrom S, Bergh A, Damber JE. Vascular endothelial growth factor content in metastasizing and nonmetastasizing Dunning prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2000;45:42-50.;
36. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C.; CD105 and angiogenesis. *J Pathol*. 1996; 178: 363-366.;
37. Kumar S, Ghellal A, Li C, e tal. Breast carcinoma: vascular density determined using CD 105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999;178:363-366.;
38. Saad RS, Jasnosz KM, Silverman JF. Endoglin (CD 105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2003; 22: 248-253.;
39. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, e tal. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical câncer. *Obstet Gynecol*. 2000;96:224-228.;
40. Saad RS, Liu YL, Nathan G, e tal. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal câncer development. *Mod Pathol*. 2004; 17: 197-203.;
41. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, e tal. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the processo f colorectal câncer development. *Surgery*. 20002; 131 (1 suppl): S109-S113.;
42. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, e tal. Overexpression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-indeuced neovascularization. *Anticancer Res*. 1998; 18:3621-3628.;
43. 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 Jun 12.;
44. Jie-Ge Jiao e tal.; A DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces antitumor immunity in a mouse colon carcinoma model; 2005 Oct ;24:1179-83.;
45. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, e tal. Quantification of angiogenesis insolid human tumors: na international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996; 32: 2474-2484.;
46. Modlin et al. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97:934-959. 2003.;
47. Günter Klöppela 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.;
48. Baris Turkbey, Hisataka Kobayashi, Mikako Ogawa, Marcelino Bernardo and Peter L. Choyke.; *Imaging of Tumor Angiogenesis: Functional or Targeted?* *AJR* 2009; 193:304-313.;
49. Josephs D, Spicer J, O'Doherty M.; *Molecular imaging in clinical trials.*; *Target Oncol*. 2009 Sep;4(3):151-68. Epub 2009 Sep 21.;
50. Sarah E. Duff et al.; CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications.; *FASEB Journal*. 2003;17:984-992.;
51. Nikolaos A. Dallas, Shaija Samuel, Ling Xia, Fan Fan, Michael J. Gray, SherryJ. Lim, and LeeM. Ellis.; *Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy.*; *Clinical Cancer Research* April 2008 14; 1931.