

# Cancro Avançado do Pulmão doença previsível ?

## Advanced Lung Cancer a Predictable Disease ?

V. ESPANHOL\*, F. SANSONETTY\*\*, I. AMENDOEIRA\*, A. MARQUES\*

\* H. S. João  
\*\* IPATIMUP

Recebido para publicação: 01.03.16

Aceite para publicação: 01.06.19

### RESUMO

O carcinoma do pulmão continua a ser a maior causa de mortalidade por cancro em grande parte dos países. O hábito de fumar, a incapacidade do rastreio em reduzir a taxa de mortalidade, o diagnóstico tardio e a inexistência de tratamento eficaz para as situações avançadas, são as razões mais relevantes para esta situação.

O objectivo foi determinar o contributo, da ploidia do ADN e da percentagem de células em fase de síntese do ciclo celular(fase S), associadas a características clínicas bem conhecidas, na avaliação prognóstica dos doentes com carcinoma avançado do pulmão e identificar entre os parâmetros estudados alguns que pudessem servir de marcadores do comportamento da doença.

Estudaram-se prospectivamente 93 doentes com carcinoma do pulmão diagnosticados e tratados no Serviço de Pneumologia do H.S. João.

Os doentes eram predominantemente do sexo masculino,70 (75%) e 23 (25%) do sexo feminino com 64 anos de idade mediana. O estado geral da maioria dos doentes era bom, só 12 doentes estavam gravemente limitados. Setenta e quatro doentes (80%) apresentavam doença avançada, sendo em 57 (61,3%) metastática. Dezanove casos (20%) eram carcinomas de células pequenas,41 eram adenocarcinomas e 25 eram carcinomas epidermóides.

A análise da sobrevida permitiu identificar como principais factores: o estado geral (Zubrod), o estágio da doença, as contagens, leucocitária e linfocitária, a fosfatase alcalina, a ploidia do ADN e a % de células em fase S. Assinale-se, que a presença de aneuploidia e % de células em fase S  $\geq 15\%$ , se associaram a bom prognóstico, ao contrário do referido na maioria dos estudos publicados.

Na análise do comportamento da doença identificaram-se três parâmetros: o estado geral, a % de células em fase S e o valor das proteínas séricas totais. Utilizando estes parâmetros foi possível prever a evolução tumoral na grande maioria dos doentes.

Concluimos referindo o importante contributo adicional, dos dois parâmetros tumorais de índole biológica estudados quando associados aos de natureza clínica, tanto na avaliação do prognóstico como na determinação do comportamento da doença.

REV PORT PNEUMOL 2001; VII (3):

**Palavras-chave:** Carcinoma do pulmão, citometria de fluxo, factores de prognóstico, marcadores do comportamento da doença

Abreviaturas: QT – Quimioterapia; RT – Radioterapia; CPVPCiclofosfamida+Carboplatino+Etoposido; VP – Vinorelbine+Carboplatino; VPM – Vimblastina+Carboplatino+Mitomicina C.

## SUMMARY

**Lung Cancer continues to be a major cause of death from cancer in most countries mainly due to continued smoking, late diagnosis and the lack of an effective treatment.**

**The objective was to evaluate the prognostic significance of clinical evaluation in association with two biological markers: DNA ploidy and S phase fraction determined by flow cytometry.**

We studied 93 patients with cancer of the lung diagnosed and treated at the São João Hospital Department of Pneumology. They were predominantly male 70 (75%) and mean age was 64 years the majority with good performance status; only 12 patients were severely disabled. Seventy-four patients (80%) presented with advanced disease, and this was metastatic on diagnosis in 57 (61.3%). Nineteen cases (20%) were small cell cancers; 41 were adenocarcinomas and 25 were squamous cell carcinomas. Forty seven (50.5%) were aneuploid and 22 had “high” S phase fraction.

The survival analysis enabled us to identify the following as the principle independent prognostic factors: PS, stage of the disease, leukocyte and lymphocyte counts, alkaline phosphatase, DNA ploidy and the S phase fraction. We noted that the presence of aneuploidy and a S phase fraction  $\geq 15\%$ , was associated with a good prognosis.

The principle indicators of the disease progression were: PS, S phase fraction and the value of total serum proteins.

We conclude by referring the importance of using clinical evaluation and biological markers in association, on prognostic evaluation and as indicators of the progression of the disease.

REV PORT PNEUMOL 2001; VII (3):

**Key-words:** lung cancer, flow cytometry, prognostic factors, disease progression indicators

## INTRODUÇÃO

O cancro do pulmão continua a ser uma das principais causas de mortalidade relacionadas com cancro<sup>1</sup>. Em 1997, diagnosticaram-se 178.000 novos casos e 160.400 doentes morreram desta doença<sup>2</sup>.

Em Portugal, embora sem esta relevância, o número de casos de cancro do pulmão tem vindo a aumentar, constituindo no sexo masculino a causa mais importante de mortalidade por cancro<sup>3,4</sup>.

Ao contrário do que se passa em Portugal<sup>3</sup>, nos Estados Unidos a incidência global do cancro do pulmão tem vindo a decrescer<sup>2</sup> nos últimos anos, acompanhando a redução observada no consumo de tabaco nas duas últimas décadas.

A procura de novos conhecimentos que possam melhorar as medidas preventivas e apontar para tratamentos mais eficazes do cancro do pulmão mantém-se. O crescente conhecimento da biologia tumoral, a existência de fármacos menos tóxicos e tratamentos de suporte mais adequados, associados à visão multidisciplinar do tratamento dos doentes com cancro do pulmão, tem permitido melhorar as perspectivas de tratamento destes doentes<sup>5,6,7,8</sup>.

Se nos reportarmos às situações menos frequentes em que é possível erradicar cirurgicamente todo o tumor detectável pelos métodos actuais, esperando-se uma terapêutica “potencialmente curativa”, o tipo de recorrência do tumor não depende do estágio nem do tipo histológico. Aparentemente, o fenómeno ou fenómenos do (s) qual (ais) depende o tipo de recorrência tumoral está associado a componentes biológicos não quantificáveis, relacionados com a agressividade tumoral<sup>9</sup>.

Múltiplas características dos doentes e dos tumores têm vindo a ser testadas, não só como índices de prognóstico, mas também para tentar identificar factores importantes na escolha e na adequação da terapêutica a cada doente.

Além dos factores clínicos bem estabelecidos, como o estágio da doença, perda de peso, estado geral e sintomas gerais<sup>10,11</sup>, outras características do tumor como tamanho<sup>12</sup>, grau de diferenciação e invasão vascular<sup>13</sup> e subtipo histológico (epidermóide ou não)<sup>13,14</sup> e do hospedeiro, como o sexo, a idade e os sintomas de apresentação, têm sido apontadas em diversos estudos realizados nas duas últimas décadas<sup>10,12,13, 14</sup>. As grandes dificuldades de manuseamento do cancro do pulmão têm mantido estas investigações. Neste sentido, surgem desde os anos 80 estudos que procuram identificar possíveis marcadores biológicos, entre os quais se incluem marcadores da actividade proliferativa tumoral avaliada por citometria de imagem ou de fluxo. A avaliação do conteúdo de ADN e a análise do ciclo celular com quantificação das várias fases deste ciclo, incluindo a fracção de células em fase de síntese (fase S)<sup>15,16,17,18</sup>, também têm sido estudadas. Apesar do elevado número de investigações, verifica-se que a generalidade dos doentes incluídos são submetidos a tratamento cirúrgico, encontrando-se em estádios precoces da doença. Frequentemente não são analisadas simultaneamente variáveis relacionadas com a biologia tumoral e parâmetros clínicos com importância e significado bem padronizados<sup>15,16,19-30</sup>. Os métodos de selecção dos doentes e as metodologias<sup>31,32</sup> são diferentes, pelo que não admira a disparidade de resultados e conclusões<sup>19-30</sup>.

Neste estudo incluíram-se, em grande parte, doentes com carcinoma do pulmão em estádios avançados, avaliaram-se parâmetros de natureza clínica já estudados em investigações anteriores<sup>11</sup>, e outros relacionados com a avaliação do conteúdo em ADN das células neoplásicas através de citometria de fluxo.

## OBJECTIVO

Analisar algumas características demográficas, clínicas, morfológicas e biológicas de doentes com carcinoma do pulmão e determinar a sua importância no comportamento da doença e na avaliação prognóstica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Doentes

Estudaram-se 93 doentes com carcinoma primitivo do pulmão, com 64 anos de idade mediana, 70 (75%) do sexo masculino e 23 (25%) do sexo feminino, diagnosticados, tratados e seguidos no Serviço de Pneumologia do H.S. João entre 1993 e 1996.

A idade mediana global foi de 64 anos, ligeiramente superior no sexo masculino. Só 4 doentes tinham idade inferior a 45 anos. A maior parte dos doentes tinha sido saudável até à altura do diagnóstico; treze doentes (15%) tinham critérios de diagnóstico de DPOC e 9 (10%) tinham tido tuberculose, tratada convenientemente. Os doentes do sexo masculino eram fumadores activos, salvo 4 que tinham parado de fumar há pelo menos 5 anos; todas as doentes eram não fumadoras. O hábito de fumar remontava em média há  $36 \pm 17^*$  anos e o número de cigarros por dia atingia em média  $34 \pm 12,5^*$ , cigarros. Só 4 doentes tinham história de neoplasia familiar, nunca incluindo neoplasia do pulmão.

---

\* desvio padrão

As razões mais frequentes da vinda dos doentes à consulta foram: dor torácica em 20 (21,5%), dispneia em 19 (20,4%), tosse em 13 (14%), e sintomas gerais em 10 (11%). Outros motivos, especialmente hemoptises, pneumonias e dores ósseas inespecíficas, também surgiram com alguma frequência. É importante referir que só em dois casos não havia sintomas, tendo a lesão pulmonar sido encontrada na radiografia de tórax efectuada por rotina.

O estado geral era globalmente bom; só 12 (13%) doentes se encontrando gravemente limitados na altura do diagnóstico. Dos restantes, 54 (58%) mantinham vida activa e 27 (29%) estavam limitados ao domicílio, conseguindo contudo bastar-se a si próprios nas tarefas individuais.

A histologia incluía 41 (44%) adenocarcinomas, 25 (27%) carcinomas epidermóides, 19 (20%) carcinomas de células pequenas e 8 (9%) carcinomas indiferenciados.

A maioria dos doentes (61,3%) apresentava doença metastática na altura do diagnóstico; dos restantes, 5 (5,4 %) tinham a sua doença no estágio IIB, 14 (15%) no estágio IIIA e 17 (18,3 %) no estágio IIIB.

O estadiamento dos doentes seguiu o protocolo específico, em uso no Serviço de Pneumologia do H.S. João para doentes com neoplasia do pulmão. Todos foram submetidos a um estudo que incluiu história clínica, exame físico, avaliação analítica (hemograma, bioquímica de sangue e urina, bacteriologia de expectoração, radiografia de tórax de face e perfil, TAC tórax, ecografia abdominal, cintilograma ósseo e provas de função respiratória). A broncofibroscopia foi geralmente realizada para diagnóstico e/ou estadiamento. A TAC cerebral só foi efectuada quando existia suspeita de envolvimento cerebral. A radiografia do esqueleto foi realizada se clinicamente havia evidência de metastização, confirmada ou não, pelo cintilograma ósseo; por vezes foi utilizada a TAC quando a radiografia não era esclarecedora. A toracocentese, com ou sem biópsia, foi usada essencialmente para diagnóstico, embora algumas vezes também tenha sido realizada para determinar a extensão da doença.

Na altura do diagnóstico cada doente foi avaliado de acordo com a orientação acima definida. Foram incluídos os seguintes parâmetros: idade, sexo, hábito tabágicos, exposição profissional, doenças prévias (DPOC, tuberculose, outros cancros,...), sintomas iniciais, perda de peso nos últimos dois meses, estado geral (escala de Zubrod), existência de síndromas paraneoplásicos, síndrome da veia cava superior, citologia/histologia do tumor, radiografia de tórax, envolvimento tráqueo-brônquico, extensão da doença (TNM), hematologia (hemoglobina, leucócitos, neutrófilos e linfócitos), bioquímica (cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, desidrogenase láctica, proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, glicose, ácido úrico, bilirrubinas, transaminases, e gama glutamiltransferase) e ionograma. Além destas características foram estudados: o índice do ADN, ploidia do ADN (de acordo com a existência ou não de pico aneuplóide no histograma) e a fracção de células em fase de síntese do ADN (fase S).

O tratamento foi baseado na análise de cada caso, em reunião semanal multidisciplinar, especificamente voltada para a decisão terapêutica dos doentes diagnosticados e estadiados nessa semana (Quadro I).

A cirurgia foi realizada em 8 doentes (8,6%); em 4 doentes foi realizada como terapêutica isolada (4,3%). Nos restantes 4 casos foi efectuada radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante. O tratamento mais utilizado foi a terapêutica combinada, associando quimioterapia e radioterapia torácica, nos estádios IIIA e IIIB. Este tratamento foi ministrado de acordo com a modalidade sequencial – 3 ciclos de quimioterapia - 45 Gy Co<sup>60</sup> – 3 ciclos de quimioterapia. Nos doentes com metástases à distância, a quimioterapia isolada foi o tratamento mais utilizado.

O tratamento de suporte foi a única terapêutica utilizada em 13 doentes (14%) que, devido a terem condição global muito deficiente, não foram considerados candidatos para qualquer outro tratamento. Este tratamento, além das medidas gerais de suporte nutricional, controlo da dor e da dispneia, incluiu medidas paliativas que envolveram radioterapia de metástases ósseas, cerebrais e laserterapia tráqueo-brônquica.

**QUADRO I**  
Esquemas terapêuticos

<b>TERAPÊUTICA</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>	<b>%</b>
Cirurgia isolada	4	4,3
Cirurgia + QT/RT	6*	6,4
CPVP + RT	11	11,8
CAV + RT	8	8,6
CARB+VINORELBINE + RT	5	5,4
VPM	24	25,8
VP/VPM+RT	15	16,2
RT isolada	7	7,5
Suporte	13	14,0

\*dois doentes submetidos a toracotomia exploradora (VPM+RT+VPM)

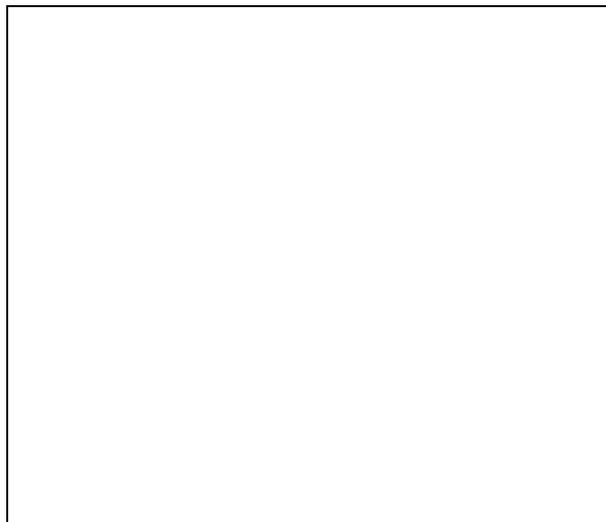
A resposta ao tratamento (Quadro II) foi avaliada após o terceiro ciclo de quimioterapia, ou após RT. A medição das lesões foi efectuada por dois médicos de acordo com os critérios da OMS. Durante o tratamento os doentes foram observados cada duas semanas e, posteriormente, mensalmente.

**QUADRO II**  
Resposta ao tratamento

<b>RESPOSTA</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>	<b>%</b>
Cirurgia	8	8,6
Não avaliáveis*	13	14,0
Resposta completa	2	2,2
Resposta parcial	10	10,8
Estabilização	23	24,7
Progressão	37	39,7

\* tratamento de suporte

A sobrevida mediana global (Fig. 1) foi de 6,0 meses, com mais de 35% dos doentes ultrapassando o primeiro ano de sobrevida e 17% os dois anos.



**Fig. 1**– Sobrevida global

## MATERIAL

As amostras foram colhidas pelas técnicas mais adequadas à obtenção do diagnóstico, em cada caso particular. As técnicas utilizadas foram: a biópsia brônquica (BBR) em 68 casos (47%), a escovagem brônquica (EB) em 27 casos (18%) e a biópsia aspirativa transtorácica (BAT) nos restantes 51 (35%).

Dado que só era processado o material excedentário após estabelecido o diagnóstico citológico/histológico, muitos doentes foram excluídos por insuficiência de material. Esta metodologia motivou que fossem utilizadas amostras obtidas por técnicas diferentes o que poderia aumentar a variabilidade dos resultados finais.

O processamento das amostras<sup>34</sup> dependeu da técnica utilizada na sua colheita. Quando se tratou de fragmentos obtidos por BBR, foi realizado previamente um teste de identificação de malignidade nesse mesmo fragmento. Neste rastreio de malignidade foi utilizado o "IMPRINT" em lâmina. Foram rejeitados todos os fragmentos nos quais não foram identificadas células neoplásicas no "imprint". Quando se tratou de EB ou BAT, o rastreio de malignidade foi a citologia.

Uma vez seleccionadas para citometria, as amostras foram suspensas numa solução de dimetilsulfóxido a 11% e criopreservadas, sendo oportunamente processadas.

## ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Na realização da CF foi utilizado um citómetro de fluxo Coulter Epics C.

De cada amostra foi obtida uma suspensão nuclear após homogenização mecânica e/ou adição de um detergente (NP. 40), à qual foi adicionada a referência interna do laboratório (núcleos de eritrócitos de galinha) e corada com iodeto de propídeo.

Obtiveram-se histogramas (Figs. 2 e 3) representando o ADN que foram analisados por um "software" específico (Multicycle), permitindo a determinação do índice do ADN (ID) e da fracção de células em fase-S.

A aneuploidia foi determinada estimando o índice de ADN (razão das modas dos picos de fluorescência das populações celulares normais e anormais, em G0/G1). O IPR foi calculado como a percentagem de células na fase S do ciclo celular.

**Fig.2** – Histograma que revela a presença de núcleos com conteúdo em ADN "aneuploide"

**Fig.3** – Histograma com população nuclear "diploide"

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram estudadas quinze características clínicas e duas obtidas por citometria de fluxo: ploidia do ADN e % de células em fase S. A escolha das características clínicas mais relevantes, baseou-se em estudos anteriores<sup>11, 35</sup>. Estes parâmetros foram relacionados com a sobrevida, tentando-se definir quais, isoladamente ou em associação, melhor pudessem explicar a sobrevida. Secundariamente, estabeleceu-se um modelo preditivo do comportamento da doença, após tratamento anti-neoplásico.

As curvas de sobrevida, para cada estrato de cada parâmetro estudado, foram calculadas de acordo com o método de Kaplan Meier<sup>36,37</sup> e comparadas usando o teste do logrank<sup>35,36</sup>. As variáveis contínuas foram transformadas em variáveis dicotômicas (0/1), antes da análise, de acordo com os parâmetros laboratoriais aceites. Em casos especiais como a contagem de leucócitos, foi criada a variável - leucocitose não - 0 / sim - 1; em relação à perda de peso, foi criada a variável <10% - 0 / ≥ 10% - 1. Não foram incluídos na análise os grupos etários e à existência ou não de sintomas, na altura do diagnóstico, pelo número diminuto de casos numa das categorias de cada variável. As restantes características foram definidas como variáveis categóricas, com dois (sexo, ploidia, ...) ou mais estratos (estado geral). Na análise dos grupos histológicos, cada tipo histológico foi considerado uma variável dicotómica (p. ex.: adenocarcinoma 0-não/1 -sim)

A análise multifactorial foi realizada utilizando a regressão de Cox<sup>38,39,40</sup>, para determinar o valor de cada um dos parâmetros estudados na sobrevida, em presença de todas as outras variáveis. Todos os parâmetros testados na análise unifactorial foram incluídos no modelo multifactorial. A admissão de variáveis foi precedida pela verificação das suposições do modelo<sup>40</sup>

O melhor modelo preditivo foi obtido pelo método da adição progressiva de variáveis, calculando-se o índice prognóstico (IP) de cada doente pela fórmula ( $\Sigma$ [coeficiente x pontuação de cada variável do modelo]), foram deste modo criados grupos prognósticos.

Na determinação do modelo preditivo da progressão da doença após tratamento, foi utilizada a regressão logística, tendo sido calculada a sensibilidade e a especificidade do modelo. O programa de estatística usado foi o "STATA statistical software package"<sup>39</sup>.

## RESULTADOS

### Análise Univariada

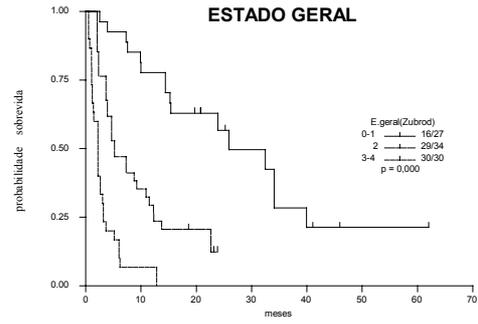
A análise univariada (Quadro III) da sobrevida (Figs. 4 e 5) mostrou que o estado geral (Zubrod), os sintomas gerais, o estágio da doença, a perda de peso ≥10%, albumina sérica (proteínas totais) e o índice proliferativo, são os factores de prognóstico mais relevantes. Outras características estudadas: obstrução tráqueo-brônquica, hemoglobina, neutrófilos e ploidia, também mostram influenciar a sobrevida, embora com menor relevância. O sexo dos doentes e o tipo histológico das neoplasias uma associação significativa com a sobrevida.

**QUADRO III**  
Análise Univariada

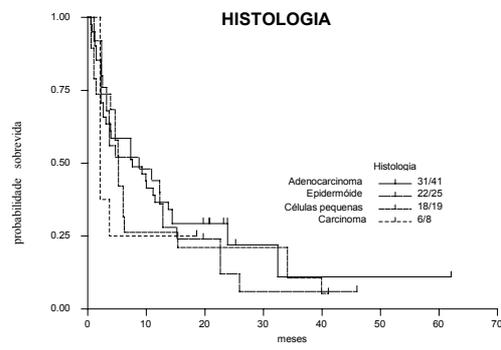
Variável (pontuação)	Casos <sup>a</sup>	Valor - p	R.R. <sup>b</sup>	I.C. 95% <sup>c</sup>
<b>E. Geral (Zubrod)</b>				
0-1 (1)	27	0,000		
2 (2)	27		1,65	1,17-2,33
3-4 (3)	39		1,58/2,57	2,03-3,25
<b>Sexo</b> F (1)/M (2)	23/70	0,87	0,98	0,73-1,31
<b>Sint. Gerais</b> N (0)/S (1)	14/62	0,004	1,74	1,28-2,37
<b>Estádio (TNM)</b>				
IIB-III A (1)	19	0,006		
IIIB (2)	17		1,61	1,23-2,10
IV (3)	57		1,10/1,82	1,30-2,54
<b>Histologia</b>				
Adenocarcinoma (0/1)	41	0,74		
C. epidermóide (0-1)	25		0,94	0,93-1,05
Células pequenas (0/1)	19		0,91	0,91-1,07
Carcinoma (0/1)	8		-	
<b>Obst.tráqueo-brônq.</b>	27/66	0,004	1,72	1,27-2,32
Não (0)/Sim (1)				
Perda peso	58/35	0,000	1,61	1,32-1,95
<10% (0) / ≥ 0% (1)				
<b>Hemoglobina</b> (g/dl)	15/78	0,006	1,49	1,19-1,88
<12 (0) / ≥ 12 (1)				
<b>Leucócitos</b> (mm <sup>3</sup> )	68/25	0,002	1,29	1,03-1,62
< 10500 (0) / ≥ 10500 (1)				
<b>Neutrófilos</b> (mm <sup>3</sup> )	74/19	0,001	1,44	1,15-1,79
< 8000 (0) / ≥ 8000 (1)				
<b>Linfócitos</b> (mm <sup>3</sup> )	59/18	0,000	1,55	1,27-1,90
< 1500 (0) / ≥ 1500 (1)				
<b>DHL</b> (UI/l)	34/59	0,29	1,13	0,90-1,43
< 320 (0) / ≥ 320 (1)				
<b>F.alcalina</b> (UI/l)	35/56	0,14	1,19	0,94-1,50
< 90 (0) / ≥ 90 (1)				
<b>Proteínas totais</b> (g/l)	29/64	0,000	1,77	1,48-2,11
< 66 (0) / ≥ 66 (1)				
<b>Albumina</b> (g/l)	26/67	0,000	1,41	1,12-1,79
<35 (0) / ≥ 35 (1)				
<b>Ploidia</b>	47/46	0,043	1,25	1,10-1,56
Aneup (1) / dipl (2)				
<b>% de células em fase S</b>	50/22	0,004	1,48	1,13-1,92
(%)				
<15 (0) / ≥ 15 (1)				

<sup>a</sup> casos com seguimento completo, ou ainda em seguimento    <sup>b</sup> Risco relativo    <sup>c</sup> Intervalo de confiança 95%

(a)



(b)



(c)

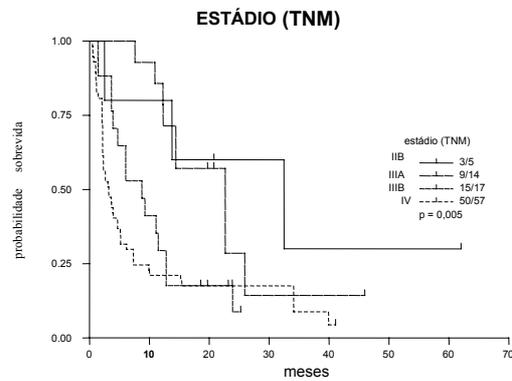
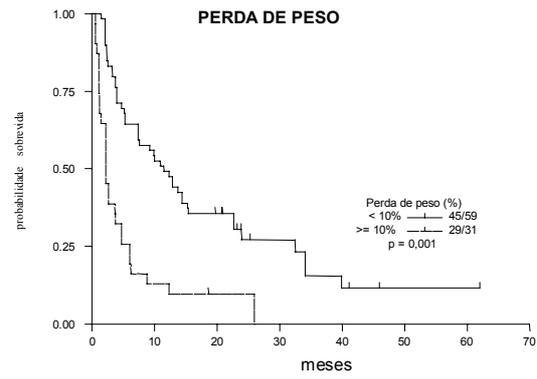
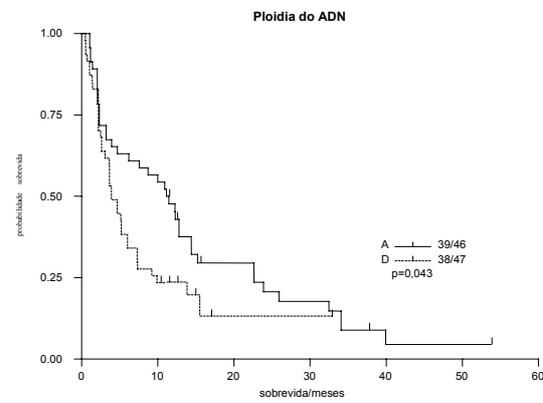


Fig.4 – Análise univariada da sobrevida de acordo com: (a) categorias de estado geral (Zubrod); (b) grupos histológicos; (c) estágio (TNM)

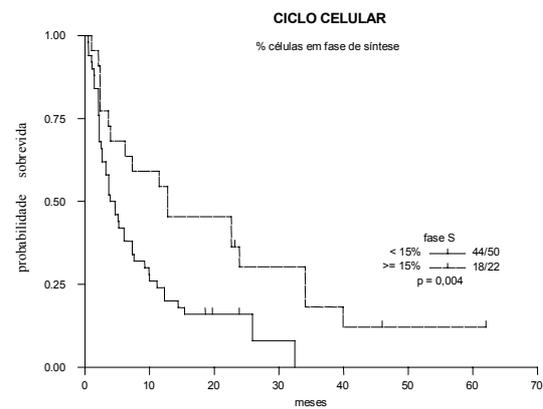
(a)



(b)



(c)



**Fig.5** – Análise univariada de acordo com: (a) perda de peso  $\geq 10\%$ ; (b) ploidia do ADN; (c) fração de células do tumor em fase de síntese de ADN

Os doentes com estado geral (Zubrod) “3-4”, perda de peso  $\geq 10\%$ , com sintomas gerais na altura do diagnóstico, doença avançada, albumina sérica inferior a 35 g/l e % de células em fase S inferior a 15%, têm um risco de morte precoce que poderá variar entre 1,48-2,57, para cada um destes factores.

### ANÁLISE MULTIVARIADA – Modelo de Cox

Esta análise permitiu encontrar duas características: a ploidia do ADN e a fracção de células em fase-S que se associam de forma significativa e independente com a sobrevida. Assim, uma elevada percentagem de células em fase S associa-se a sobrevida mais longa, o mesmo se observando nos doentes com aneuploidia (Quadro IV).

**QUADRO IV**

Análise multivariada

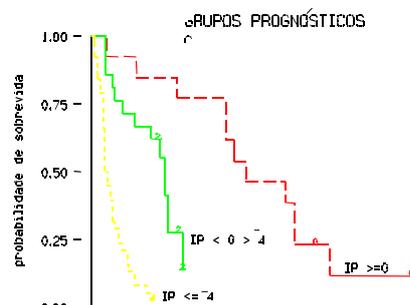
Variável	Estratos	Pontuação	Coefficiente	R.R. <sup>a</sup>	p	I.C. 95% R.R. <sup>b</sup>
E.geral <sup>c</sup>	0-1/2/3-4	0/1/2	0,719	2,054	0,000	1,526-2,764
% Fase S	<15/≥15	0/1	-1,705	0,181	0,000	0,089-0,367
Estádio(TNM)	IIB-III A/IIIB/IV	1/2/3	0,597	1,816	0,001	1,256-2,626
Linfócitos	<1500/≥1500	0/1	-1,774	0,169	0,000	0,084-0,341
Leucócitos	<10500/≥10500	0/1	1,338	3,811	0,000	1,948-7,457
F.alcalina	<320/≥320 U/l	0/1	0,589	1,803	0,039	1,029-3,160
Ploidia	A/D	½	0,623	1,866	0,046	1,010-3,446

<sup>a</sup> risco relativo <sup>b</sup> intervalo de confiança 95% do risco relativo <sup>c</sup> escala de Zubrod

Nº de observações: 347 p=0,000 (do modelo)

Outros factores como estado geral (Zubrod), estágio da doença, contagem de leucócitos e de linfócitos e a fosfatase alcalina, também foram identificados como importantes factores prognósticos (Quadro III). Os doentes com bom estado geral, contagem leucocitária e linfocitária normais, fosfatase alcalina normal e doença circunscrita ao tórax, têm sobrevidas mais longas.

Calculando o índice prognóstico (IP)<sup>11</sup>, foi possível identificar três grupos com sobrevidas diferentes. A observação das curvas de sobrevida correspondentes a cada um destes grupos (Fig.6) permite prospectivamente estimar de forma aproximada o prognóstico.



**Fig.6** – Grupos prognósticos

Além da informação relacionada com a sobrevida ao longo do tempo, é possível determinar, a priori qual a probabilidade de um doente sobreviver um período de tempo determinado (p. ex.: 6, 12, ou 24 meses, após diagnóstico) (Fig.7).

Como se observa, a maior parte dos doentes estudados tem uma elevada probabilidade de sobreviver pelo menos 6 meses. Para um doente ter, pelo menos, 50% de probabilidade de sobrevida aos 2 anos, deverá ter um índice prognóstico de  $-1$  ou inferior. Para obter esse IP é necessário que a % de células em fase de síntese seja superior a 15% a contagem linfocitária superior a 1500/mm<sup>3</sup> (variáveis com coeficiente negativo) e as restantes variáveis (coeficiente positivo) tenham pontuações (Quadro IV) baixas. Isto implica um doente no estado geral "0-1" da classificação de "Zubrod" fosfatase alcalina e leucócitos dentro da normalidade, um tumor aneuplóide, no estágio IIB ou IIIA (Quadro IV).

**Fig. 7** – Previsão da sobrevida aos 24 (A), 12 (B) e 6 (C) meses

Apesar do tratamento efectuado, a taxa de resposta (OMS) completa e parcial foi baixa (13%) (Quadro II).

O reduzido número de respostas observado torna difícil identificar se existem características que possam de alguma forma ajudar a seleccionar os doentes que mais poderão beneficiar do tratamento.

Se excluirmos os doentes operados e os que efectuaram tratamento de suporte, restam-nos 72 doentes que foram tratados com quimioterapia e/ou radioterapia. Destes, 37 progrediram apesar do tratamento. Em 35 doentes o crescimento tumoral foi controlado. Em 23 casos observou-se uma redução do tumor, inferior a 50% (estabilização); em 10 casos, redução do tumor superior a 50% (resposta parcial) e em dois casos, verificou-se o desaparecimento total do tumor (resposta completa) (Quadro V).

**QUADRO V**

Resposta ao tratamento

% de células em fase S  $\geq$  15

RESPOSTA	% de células em fase S $\geq$ 15		TOTAL
	Não	Sim	
PROGRESSÃO	26	11	37
ESTABILIZAÇÃO	10	13	23
R.PARCIAL	2	8	10
R.COMPLETA	0	2	2
TOTAL	38	34	72

Teste exacto de Fisher  $p = 0.016$ 

Ploidia

RESPOSTA	Ploidia		TOTAL
	Aneuplóide	Diplóide	
PROGRESSÃO	9	28	37
ESTABILIZAÇÃO	12	11	23
R.PARCIAL	5	5	10
R.COMPLETA	2	0	2
TOTAL	28	44	72

Teste exacto de Fisher  $p=0,045$ % de células em fase S  $\geq$  15

RESPOSTA	% de células em fase S $\geq$ 15		TOTAL
	Não	Sim	
PROGRESSÃO	26	11	37
N/PROGRESSÃO	12	23	35
TOTAL	38	44	72

Pearson  $\chi^2 = 4,95$   $p = 0,026$ 

Ploidia

RESPOSTA	Ploidia		TOTAL
	Aneuplóide	Diplóide	
PROGRESSÃO	9	28	37
N/PROGRESSÃO	19	16	35
TOTAL	28	44	72

Pearson  $\chi^2 = 3,87$   $p = 0,048$ 

Utilizando um modelo de regressão logística e incluindo as mesmas variáveis já definidas no estudo da sobrevida, foi possível identificar as características mais frequentemente associadas à progressão da doença (Quadro VI).

**QUADRO VI**

Marcadores de progressão da doença

Estimativa Logística

Número de obs. =72\*

Prob. = 0.0000

	Risco Relativo	Erro padrão	z	p	[Intervalo Confiança 95%]	
Egeral <sup>a</sup>	.3638277	.1208304	-3.044	0.002	.1897598	.6975693
Protcat <sup>b</sup>	13.373192.	12.68763	2.733	0.006	2.082902	85.862
%Fase S	2.786008	1.402993	2.035	0.027	1.038316	7.47541

\*observações completas para todas as variáveis <sup>a</sup>estado geral (zubrod) <sup>b</sup>proteínas totais

A adequação deste modelo aos 72 doentes estudados foi elevada permitindo identificar a progressão da doença após tratamento, com uma sensibilidade que ultrapassa os 90% e uma especificidade de 82,5% (Quadro VII) (Fig.8).

**Quadro VII**  
Precisão do modelo

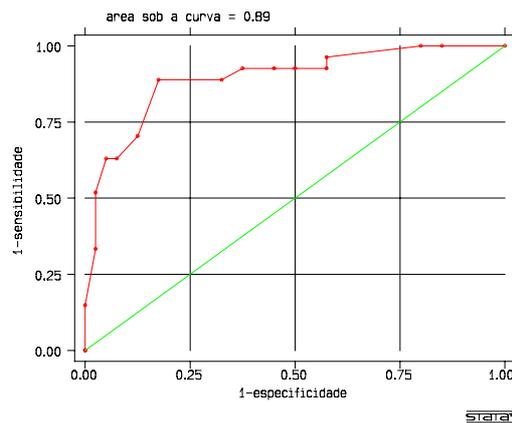
Observados	Doentes Classificados pelo modelo		Total
	Progressão	não progressão	
progressão	33	7	40
não progressão	3	29	32
<i>Total</i>	36	36	72

Sensibilidade	90.63%	Especificidade	82.50%
Taxa de falsos (+)	19.44%	Taxa de falsos (-)	8.33%
Valor preditivo(+)	80.56%	Valor preditivo (-)	91.67%

Torna-se relevante referir, dado que foram incluídos neste estudo 18 doentes com carcinoma de células pequenas, que foi testada a influência da histologia, células pequenas sim/não, tanto na sobrevivência como na identificação da progressão da doença. Em nenhuma destas avaliações foi encontrada associação significativa.

A precisão do modelo foi complementada calculando a “àrea sob a curva” que permitiu demonstrar que o modelo obtido permitia identificar o comportamento da doença em quase 90% dos doentes estudados.



**Fig.8** – Precisão do modelo logístico – previsão da progressão tumoral

## DISCUSSÃO

O carcinoma do pulmão continua entre nós a ser diagnosticado tardiamente. Nesta pequena amostra, os carcinomas já disseminados na altura do diagnóstico aparecem em mais de metade dos doentes incluídos no estudo (57/93 – 61,3%).

Na maioria das situações, o cancro do pulmão já não se encontra circunscrito na altura do diagnóstico, invadindo extensamente o tórax, ou mesmo ultrapassando os seus limites. As linhas de orientação terapêutica baseiam-se em ensaios clínicos que incluíram doentes que não constituem uma amostra fiel dos doentes que nos consultam por esta patologia. Pelo contrário, são doentes seleccionados por terem “bons factores de prognóstico”. Nesta situação, torna-se difícil generalizar ao comum dos doentes as conclusões extraídas desses estudos. Por outro lado, a eficácia dos tratamentos disponíveis para os doentes não cirúrgicos não ultrapassa, nos melhores casos, os 50%, com um tempo livre de doença sempre aleatório. Em estudos anteriores, analisámos a influência das variáveis demográficas e clínicas na sobrevida<sup>11,35</sup>. Verificámos nesses estudos que o estado geral dos doentes foi o factor determinante da sobrevida. Outros factores, como a extensão da doença, a perda de peso, os sintomas gerais e as proteínas totais (albumina), também mostraram ser importantes preditores da sobrevida dos doentes com carcinoma do pulmão localmente avançado ou disseminado. Verificou-se que grupos de doentes com aparentemente o mesmo atingimento, seguidos e tratados de acordo com os mesmos protocolos, tinham sobrevidas diferentes<sup>41</sup>. A observação destas discrepâncias levou-nos a estruturar este trabalho onde mantendo os parâmetros clínicos anteriormente analisados, adicionámos algumas características do tumor, determinadas por citometria de fluxo. Pretendíamos determinar o contributo dos parâmetros biológicos tumorais: ploidia do ADN e a % de células em fase S em conjunto com parâmetros clínicos bem conhecidos, como indicadores prognósticos da sobrevida. Adicionalmente, tentou-se encontrar, entre as características estudadas, algum marcador da progressão da doença após tratamento.

Na análise da sobrevida encontrámos como indicadores independentes de bom prognóstico: o estado geral “0-1”, estágio precoce da doença, a % fase S  $\geq 15\%$ , aneuploidia, contagens leucocitária e linfocitária e o nível sérico da fosfatase alcalina, dentro dos limites da normalidade. Esta conclusão contradiz, no que se refere à ploidia do ADN e à % de células em fase S, a maior parte do que vem descrito na literatura<sup>16,17,22,23,30,42,43,44,45,46</sup>, onde aneuploidia e % de células em fase S elevada, se associam a elevada taxa de recorrência tumoral, tempo livre de doença diminuto e sobrevida curta. Existe, contudo, uma diferença fundamental entre este estudo e a maior parte dos estudos referidos na literatura. Enquanto, na maioria daquelas investigações, os doentes foram seleccionados em estádios precoces da doença, tendo sido tratados com ressecção completa do tumor, os doentes incluídos neste estudo têm, maioritariamente, doença extensa. Por outro lado, os tipos de tratamento têm interacções com o tumor totalmente diversas. Não custa a aceitar que, num doente operado de forma radical, a taxa de recorrência seja elevada e a sobrevida mais curta, se o tumor é mais agressivo, o que certamente se associa a aneuploidia e elevada % de células em fase S. Esta situação acontece porque, apesar do tratamento ser aparentemente radical, permanecerem células tumorais não suspeitadas que rapidamente se multiplicaram originando uma recidiva. Nos doentes não tratáveis com cirurgia, as opções de tratamento envolvem interacção do agentes terapêuticos com as células tumorais. Muitos dos agentes actuam no ciclo celular, pelo que um tumor com baixa agressividade e diminuta capacidade proliferativa poderá não ser tão sensível à acção dos fármacos e radiações ionizantes utilizadas no tratamento. Ao invés de um efeito benéfico, a acção das drogas em doentes com tumores menos agressivos poderão unicamente fazer sentir os seus efeitos pela toxicidade que determinam, e não pelo seu benefício potencial. A escassez de estudos em doentes com doença extensa resulta da grande dificuldade de obtenção de amostras de qualidade devido à morbilidade potencial dos métodos de colheita que, por motivos éticos e técnicos, frequentemente dificultam a investigação. A isto não é estranho termos precisado de mais de três anos para conseguirmos 93 doentes avaliáveis quando, potencialmente, no mesmo período, seriam seleccionáveis mais de 400. De toda a procura na literatura só num trabalho<sup>47</sup>, publicado por Jeanfaivre T et al, no Bulletin du Cancér de Paris,

se expõe um estudo em carcinomas de células pequenas obtido com amostras colhidas por escovagem brônquica e no qual se conclui que um elevado índice proliferativo (avaliado a partir da % de células em fase S) se associa a melhor prognóstico.

Outro dos interesses subjacentes a este estudo, resultou da possibilidade de serem identificados, entre as características estudadas, marcadores da progressão da doença após terapêutica. Construiu-se um modelo constituído por três variáveis: estado geral do doente, % de células em fase S e proteínas totais. Este modelo, uma vez aplicado à totalidade dos doentes, permitiu, baseado nesses indicadores, identificar mais de 90% dos doentes que tiveram progressão da doença e 82,5% dos doentes em que pelo menos a doença estabilizou. São indicadores de progressão da doença: o mau estado geral do doente, proteínas totais baixas e % de células em fase S <15%. Salienta-se neste modelo a ausência da extensão da doença como preditor da progressão. Esta ocorrência explica-se pelos 72 doentes incluídos no modelo serem, na sua maior parte, doentes em estádios avançados (IIIB e IV).

De todo o trabalho, é importante salientar o papel relevante dos dois parâmetros biológicos estudados obtidos por citometria de fluxo, tanto como indicadores da sobrevida, como na identificação dos doentes que poderão, com benefício, ser tratados agressivamente. Se prospectivamente forem confirmados, estes parâmetros poderão ser relevantes clinicamente, pois facilitarão a decisão terapêutica individualizada de muitos doentes com carcinoma do pulmão que recorrem aos nossos serviços.

## BIBLIOGRAFIA

1. BELANI CP. Introduction: International Symposium on Thoracic Malignancies. *Chest suppl.* 1998; 113: 1S
2. PARKER SL, TOUG T, BOLDEN S. Cancer Statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997; 47: 5-27
3. ESTATÍSTICAS DA SAÚDE, Anuário estatístico, eds. INE, 1998
4. SILVEIRA BJ, DIAS JAA, CAYOLLA ML. Atlas de mortalidade evitável em Portugal 1980-89, ed. Departamento de estudos e planeamento da Saúde, 1993, 97
5. GREENBERGER JS, BAHRI S, JETT J, et al. Considerations in optimizing radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Chest suppl.* 1998; 113: 46S-52S
6. BELANI C, RAMANATHAN RK. Combined-modality treatment of locally advanced non-small cell lung cancer. Incorporation of novel chemotherapeutic agents. *Chest suppl.* 1998; 113: 53S-60S
7. GHAEMMAGHAMI M, JETT JR. New agents in the treatment of small cell lung cancer. *Chest suppl.* 1998; 113: 86S-91S
8. MULSHINE JL, SCOTT F. Molecular markers in early cancer detection. New screening tools. *Chest suppl.* 1995; 107: 280S-286S
9. MOUNTAIN CF New Prognostic Factors in Lung Cancer. *Biologic Prophets of Cancer Cell Aggression.* *Chest* 1995; 108: 246-254
10. GINSBERG RJ, KRIS MG, AMSTRONG JG. Cancer of the lung. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg AS, eds. *Cancer, Principles and Practice of Oncology.* Philadelphia: PA, Lippincott, 1996
11. HESPANHOL V, QUEIROGA H, MAGALHÃES A, SANTOS AR, COELHO M, MARQUES A. Survival predictors in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1995; 13: 253-267
12. GAIL MH, EAGAN RT, FELD R, GINSBERG R, et al. Prognostic factors in patients with resected stage I non-small cell lung cancer. A report from lung cancer study group. *Cancer* 1984; 54: 1802-1813
13. TAKISE A, KODAMA T, SHIMOSATO Y, WATANBE S, SUEMASU K. Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer* 1988; 61: 2083-2088
14. LIPFORD EH, EGGLESTON JC, LILLEMOR KD, SEARS DL, MOOR GW, BAKER RR. Prognostic factors in surgically resected limited-stage, nonsmall cell lung carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 357-365
15. ISOBE H, MIYAMOTO H, SHIMIZU T, HANEDA H, HASHIMOTO M, INOUE K, MIZUNO S, KWAKAMI Y. Prognostic and therapeutic significance of flow cytometric DNA content in non-small cell lung cancer. *Cancer* 1990; 65: 1391-1395
16. ZIMMERMAN PV, BINT MH, HAWSON GAT, PARSONS PG. Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet* 1987; 2: 530-533
17. KOLODZIEJSKI L, NIEZABITOWSKI A, GASINSKA A. Clinical and flow cytometric prognostic factors in surgically treated squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 16: 173-182

18. GRAZIANO SL. Non-small cell lung cancer: Clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer suppl.* 1997; 1: S37-S58
19. ICHINOSE Y, HARA N, OHTA N, YANO T, MAEDA K, ASOH H, KATSUDA Y. Is T factor of the TNM staging system a predominant prognostic factor in pathologic stage I non-small cell lung cancer? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 90-94
20. SAHIN AA, RO JY, EL-NAGGAR AK, LEE JS, AYALA AG, TEAGUE K, HONG WK. Flow cytometric analysis of DNA content of non-small cell lung cancer. Ploidy as a significant prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1990; 65: 530-537
21. VOLM M, HAHN EW, MATERN J, MULLER T, VOGT-MOYKOPF I, WEBER E. Five-year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for survival of patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1988; 48: 2923-2928
22. FILDERMAN AE, SILVESTRI GA, GATSONIS C, LUTHRINGER DJ, HONIG J, FLYNN SD. Prognostic significance of tumor proliferative fraction and DNA content in stage I non-small cell lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 707-710
23. DAZZI H, THATCHER H, HASLETON PS, SWINDELL R. DNA analysis by flow cytometry in nonsmall cell lung cancer: Relationship to epidermal growth factor receptor, histology, tumour stage and survival. *Respir Med* 1990; 84: 217-223
24. VON BODEGOM PC, BAAK JPA, STROET-VAN GC, SCHIPPER NW, WISSE-BREKELMANS ECM, VANDERSCHURENE RGJRA, WAGENAAR SSC. The percentage of aneuploid cells is significantly correlated with survival in accurately staged patients with stage I resected squamous cell lung cancer and long-term follow-up. *Cancer* 1989; 63: 143-147
25. SCHMIDT RA, RUSCH VW, PIANTADOSI S. A flow cytometric study of non-small cell lung cancer classified as T1N0. *Cancer* 1992; 69: 78-85
26. TEM VELDE GPN, SCHUTTE B, VERMEULEN A, VOLOVICS A, REYNDERS MW, BLIJHAM GH. Flow cytometric analysis of DNA ploidy level in paraffin-embedded tissue of non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 445-460
27. CIBAS ES, MELAMED MR, ZAMAN MB, KIMMEL M. The effect of tumor size and tumor cell DNA content on survival of patients with stage I adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1989; 63: 1552-1556
28. GRAZIANO SL, TATUM AH, GONCHOROFF NJ, NEWMAN NB, KOHMAN LJ. Blood-group antigen A and flow cytometric analysis in resected early stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 87-93
29. SABATINI R, BANDIERI E, LODI R, FRASSOLDATI A, BARBIERI F, FREDERICO M. Flow cytometry DNA content in primary non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12: 347
30. RICE TW, BAUER TW, GEPHARDT GN, NEDENDORP SV, MCLAIN DA, KIRBY TJ. Prognostic significance of flow cytometry in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 210-217
31. SHANKEY VT, RABINOVITCH PS, BAGWELL B, BAUER KD, DUKE RE, HEDLEY DW, MAYALL BH, WHEELLESS L. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 472-477
32. KALLIONIEMI O-P, JOENSUU H, et al. Inter-laboratory comparison of DNA flow cytometry in interinstitutional analysis. *Cytometry suppl.* 1991; 5: 46
33. HESPANHOL V, SANTOS AR, SILVEIRA P, AMENDOEIRA I, SANSONETTY F, MARQUES A. Determinação do conteúdo de ADN no carcinoma do pulmão. *Arquivos de Medicina* 1996; 4: 246-249
34. KASTAN MB. Molecular biology of cancer: The cell cycle, In: *Cancer; Principles & Practice of Oncology*, Fifth Edition, edited by Vincent T. DeVita, Jr, Samuel Helman, Steven A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997
35. HESPANHOL V, QUEIROGA H, COELHO M, MARQUES. Análise dos factores que influenciam a sobrevida dos doentes com carcinoma de não pequenas células do pulmão submetidos a terapêutica de suporte. *Arq SPPR* 1992; 3: 111-117
36. PETO R, PIKE MC, ARMITAGE P, BRESLOW NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, Mcpherson K, Peto J, & Smith PG. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. Part II: Analysis and examples. *Brit. Journal of Cancer* 1977; 35: 1-39
37. COX DR & OAKES D. *Analysis of survival Data* eds. Chapman & Hall. London, 1984
38. CHRISTENSEN E Multivariate survival analysis using cox's regression model. *Hepatology* 1987; 6: 1346-1358
39. STATA STATISTICAL SOFTWARE, COMPUTING RESEARCHING CENTER, STATA CORPORATION, 702 University Drive East, College Station, Texas 77840, USA, 1994
40. STATA REFERENCE MANUAL: Release 3.1, vols. 1-2, 6<sup>th</sup> eds, Stata Corporation, 702 University Drive East, College Station, TEXAS 77840, USA, 1994

41. HILLERS TK, SAUVE MD, GUYATT GH. Analysis of published studies on the detection of extrathoracic metastases in patients presumed to have operable non small cell lung cancer. *Thorax* 1994; 49: 14-19
42. SALVATI F, TEODOSI L, et al. The relevance of flow cytometry DNA content in evaluation of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1994; 4: 233-239
43. YU-J, SHAEFFER J, FHU-A, KUBAN-DA, EL-MAHDI-AM, PHILPUT-CB. Flow cytometry DNA content and clinical outcome in patients with non-small-cell lung cancer given pos-operative radiation therapy. *Cytometry* 1993; 4: 428-432
44. CAGINI L, MONACELLI M, GIUSTOZZI G, MOGGI L, BELLEZZA G, SIDONI A, BUCCIARELLI E, DARWISH S, LUDOVINI V, PISTOLA L, GREGORC V, TONATO M. Biological prognostic factors for early stage completely resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*, 2000 05, 74: 1, 53-60
45. VOLM\_M; KOOMÄGI\_R. Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. *Br J Cancer*, 2000 05, 82: 10, 1747-54
46. SHANKNEY SE, SMITH CA, POLLICE A, LEVITT M, MAGOVERN JA, et al. Genetic evolutionary staging of early non-small-cell lung cancer: the P53→HER-2/NEU→ras sequence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Aug; 118(2): 259-67
47. JEANFAIVRE T, CHASSEVENT A, et al. Prognostic evaluation of small cell lung cancer by flow cytometry. A retrospective study from bronchial brushing samples. *Bull Cancer (Paris)* 1995; 5: 364-370