

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR

**DIAGNÓSTICO DE DIFERENCIAÇÃO
NEUROENDÓCRINA NO LÍQUIDO PLEURAL
ATRAVÉS DO MARCADOR MOLECULAR
CITOPLASMÁTICO ENOLASE NEURÔNIO
ESPECÍFICA**

**TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL FLUMINENSE VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
NEUROIMUNOLOGIA**

Orientadora: Elizabeth Giestal de Araújo



**NITERÓI
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CYRO TEIXEIRA DA SILVA JUNIOR

**DIAGNÓSTICO DE DIFERENCIAÇÃO
NEUROENDÓCRINA NO LÍQUIDO PLEURAL
ATRAVÉS DO MARCADOR MOLECULAR
CITOPLASMÁTICO ENOLASE NEURÔNIO
ESPECÍFICA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
2008**

“Não podemos voltar atrás e fazer um novo começo, mas podemos recomeçar e fazer um novo fim.”

Ayrton Senna

***“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.
Mas, se você tiver grandes sonhos...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.”***

Augusto Cury, 2004

S 586 Silva Junior, Cyro Teixeira da
Diagnóstico de diferenciação neuroendócrina no líquido pleural através do marcador molecular citoplasmático enolase neurônio específica/Cyro Teixeira da Silva Junior. – Niterói: [s. n.], 2008.
99f.

Tese – (Doutorado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2008.

1. Fosfopiruvato hidratase. 2. Derrame pleural. 3. Marcador biológico de tumor. I. Título.

CDD.:574.192454

BANCA EXAMINADORA

1 -
Professor Dr. Roberto Paes de Carvalho - Presidente
Universidade Federal Fluminense (UFF)

2 -
Professor Dr. Gilberto Perez Cardoso
Universidade Federal Fluminense (UFF)

3 -
Professor Dr. Eduardo Haruo Saito
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

4 -
Professor Dr. Agnaldo José Lopes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

5 -
Profa. Dra. Elizabeth Giestal de Araújo
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Dedico este trabalho:
Aos meus pais.
Aos meus irmãos.
À Regina, Clarice e Patrícia.
Ao Prof. Eraldo Silva
Ao Professor Aloysio Veiga de Paula.
Ao Professor Luiz Paulo Santos Verbicário.
Aos meus alunos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elizabeth Giestal de Araújo, coordenadora do Programa de Pós-Graduação *Strictu-Sensu* em Neurociências da Universidade Federal Fluminense, pela orientação deste trabalho, pelo incentivo constante e, principalmente, pela compreensão da importância de uma interação na UFF entre a parte básica e a parte clínica.

Ao professor Dr. Roberto Paes de Carvalho pelo incentivo constante e pela compreensão da importância de uma interação na Universidade entre a parte básica e a parte clínica. Obrigado também por ser co-orientador em minha tese de mestrado o que permitiu que a enzima adenosina desaminase ficasse mais conhecida como marcador altamente sensível e específico para o diagnóstico de tuberculose pleural.

Ao Professor Dr. Gilberto Perez Cardoso, idealizador e criador do Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, pelo convívio diário, co-autoria em diversos trabalhos e incentivo em temas de iniciação científica e pós-graduação.

A todos professores e colegas do programa de Pós-Graduação *Strictu-Sensu* em Neurociências da Universidade Federal Fluminense pela forma competente e dedicada que trabalham e pela forma carinhosa como sempre me trataram.

A Gustavo Mataruna da Silva pela ajuda constante nas aulas dos seminários.

À Maritza da Silva Rosa e a Márcia Regina Gama Pinto pela colaboração na parte de revisão nos prontuários do Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural.

À Nahara Lima, bibliotecária da Biblioteca Central do Valonguinho da Universidade Federal Fluminense, pela elaboração da ficha catalográfica.

À Professora Tânia Teixeira da Silva Nunes pela correção ortográfica minuciosa, concordâncias e estilo de linguagem em língua portuguesa.

Ao Dr. Rodolfo Fred Behrsin pela audiência nas bancas de qualificação, defesa e aula de qualificação.

Aos colegas da Disciplina de Pneumologia do Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, pelo contato diário, incentivo e aprendizado constante.

RESUMO

Introdução: Enolase neurônio-específica (NSE) é uma enzima envolvida na via glicolítica e seus níveis séricos têm sido analisados nos carcinomas de pulmão como marcador de diferenciação neuroendócrina. Entretanto, sua dosagem nos líquidos pleurais ainda não é utilizada como método diagnóstico. **Objetivo principal:** Contribuir com o estudo da enzima enolase neurônio-específica pleural (NSE-L) utilizando sua dosagem para diagnóstico diferencial entre derrame pleural benigno e maligno. **MÉTODO:** Imunofluorometria a tempo resolvido (TRF). **RESULTADOS:** NSE-L foi dosada em 70 pacientes: 20 pacientes com derrames pleurais malignos devido a NSCLC ou carcinoma brônquico de não-pequenas células (n=15), linfomas (n=4) e neuroblastoma (n=1). 50 pacientes (grupo controle) com derrames pleurais benignos por várias causas, principalmente tuberculose (33%). O grupo com malignidade foi constituído por 9 homens com uma média de idade de 67,6 anos (35–92) e o grupo controle por 30 homens com uma média de idade de 49 anos (3–94). A média de dosagens de NSE-L foi mais elevada no grupo maligno ($38,5 \pm 59,9 \mu\text{g/L}$) do que no grupo benigno ($9,35 \pm 23,7 \mu\text{g/L}$) com um valor de p bicaudal igual a 0,0304). A comparação multivariada pelo teste de Kruskal-Wallis foi estatisticamente significativa ($H=9,998$, $p=0,0067$). O teste post-hoc de Dunn calculou uma diferença estatisticamente significativa entre as doenças benignas e NSCLC ($p<0,01$), mas não entre linfomas versus NSCLC ($p>0,05$) e linfomas versus doenças benignas ($p>0,05$). Os parâmetros diagnósticos do exame da NSE-L, com valor de referência calculado de $28,5 \mu\text{g/L}$, para o diagnóstico de derrame pleural maligno foi sensibilidade de 30,0%; especificidade de 96,0 %; valor preditivo positivo de 75,0%; valor preditivo negativo de 77,0 %; eficiência de 77,1 %; razão de verossimilhança positiva de 7,5 e razão de verossimilhança negativa de 0,32. **CONCLUSÕES:** A dosagem de NSE-L apresenta potencial bioquímico para diferenciar derrames pleurais malignos e benignos.

ABSTRACT

Introduction: Neuron-specific enolase (NSE) is a glycolytic enzyme involved in the glycolysis pathway. Assays to evaluate the presence of NSE in lung cancer have been widely investigated and its presence defines neuroendocrine differentiation. However, their diagnostic values have not yet been clarified in pleural fluids (PFs). **Objective:** To determine the usefulness of NSE in PFs (L-NSE) in malign pleural effusion and its differentiation from benign effusions. **Method:** Time-resolved immunofluorometric assay (TRF). **Results:** The enzyme levels were evaluated in seventy patients with benign and malignant PFs. Twenty patients with malignant pleurisy due to non-small cell lung cancer or NSCLC (n=15), lymphomas (n=4) and neuroblastoma (n=1). Fifty control patients with benign PFs with miscellaneous causes, mainly tuberculosis (33.0%). The group of malign pleural effusion was 9 men and 11 women with average age of 67.6 years (35 to 92 years). Benign PFs were comprised of 30 men and 20 women with an average age of 49 years (3 to 94 years). The mean level of L-NSE was higher in malign pleural effusions ($38.5 \pm 54.9 \mu\text{g/L}$) than in patients with benign pleural effusions ($9.35 \pm 23.7 \mu\text{g/L}$). Two tail p value was statistically significant ($p=0.0304$). Kruskal-Wallis test with post hoc procedures compared three unpaired groups. It was statistically significant ($H=9.998$; $p=0.0067$). Post-Hoc Dunn's test revealed a significant difference of benign group versus NSCLC group ($p<0.01$) but not lymphomas versus benign group ($p>0.05$) and lymphomas versus NSCLC ($p>0.05$). L-NSE levels $\geq 28,5 \mu\text{g/L}$ in malignant pleurisy showed a sensitivity of 30,0 %, a specificity of 96,0 %, a positive predictive value of 75,0 %, a negative predictive value of 77,0 %, a positive likelihood of 7,5 a negative likelihood of 0,32 and a test accuracy of 77,1. **Conclusion:** L-NSE is useful to differentiate malignant from benign pleurisy.

SUMÁRIO

	Página
I – INTRODUÇÃO	01
II – OBJETIVOS	23
III – MATERIAIS e MÉTODOS	25
IV – CASUÍSTICA	44
V – RESULTADOS	47
VI – DISCUSSÃO e PERSPECTIVAS FUTURAS	65
VII – CONCLUSÕES	90
VIII – REFERÊNCIAS	91

LISTA DE TABELAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
Tabela 1	Marcadores Moleculares para Células Neuroendócrinas	05
Tabela 2	Imuno-Histoquímica dos Marcadores de Diferenciação Neural (Neuroendócrinos) em Câncer de Pulmão	12
Tabela 3	Fatores de Transcrição que Regulam a Diferenciação Neuroendócrina no Carcinoma de Pulmão de Pequenas Células	14
Tabela 4	Casuística do Estudo Transversal para Expressão de Fenótipo Neuroendócrino e Parâmetros Diagnósticos da Enzima Enolase Neurônio-Específica no Líquido Pleural	46
Tabela 5	Casuística dos Pacientes (n = 20) com Derrame Pleural Maligno para Expressão de Fenótipo Neuroendócrino na Síndrome do Derrame Pleural. Dosagem de Enolase Neurônio-Específica por Imunofluorometria a Tempo Resolvido	47
Tabela 6	Casuística dos Pacientes (n = 50) com Derrame Pleural Não – Maligno (Grupo Controle) para Expressão de Fenótipo Neuroendócrino na Síndrome do Derrame Pleural. Dosagem de Enolase Neurônio-Específica por Imunofluorometria a Tempo Resolvido	48
Tabela 7	Estatística descritiva das variáveis obtidas nos casos (líquido pleural maligno) e controles (líquido pleural benigno de causas diversas) dos pacientes com síndrome do derrame pleural da pesquisa	50
Tabela 8	Análise para distribuição de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov dos valores encontrados de NSE-L nos derrames pleurais malignos (casos) e controles (causas diversas) nos 70 líquidos pleurais analisados	51
Tabela 9	Comparação entre as Médias Aritméticas de Dosagem da Enolase Neurônio Específica (NSE-L) dos casos e controles pelo Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney	52
Tabela 10	Estatística Descritiva e Inferencial da Dosagem de Enolase Neurônio Específica (NSE-L) em 70 Líquidos Pleurais para Comparações Múltiplas entre as Diversas Causas de Síndrome do Derrame Pleural	52
Tabela 11	Comparações <i>Post-Hoc</i> entre as Médias de Dosagens	53

	de Enolase Neurônio-Específica nas Diversas Causas de Líquidos Pleurais Analisados com o Grupo do Derrame Pleural Maligno pelo Teste da Soma dos Postos de Wilcoxon	
Tabela 12	Comparações Múltiplas entre as Medianas de Dosagens de Enolase Neurônio Específica (NSE-L) em 70 Líquidos Pleurais	54
Tabela 13	Frequência das Causas dos 70 Líquidos Pleurais Analisados para Dosagem de NSE-L pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido em um Delineamento Transversal	55
Tabela 14	Contrabalanço entre Sensibilidade e Especificidade do Exame da NSE-L para Líquido Pleural Maligno pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido	56
Tabela 15	Cálculo das Razões de Verossimilhança para Determinação do Limiar de Reatividade do Exame da NSE-L para Líquido Pleural Maligno pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido	60
Tabela 16	Cálculo de Odds Ratio Diagnóstico (DOR) para Determinação do Limiar de Reatividade do Exame da NSE-L para Líquido Pleural Maligno pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido	61
Tabela 17	Parâmetros de Validade com Limiar de Reatividade Maior ou Igual a 28,5 µg/L do Exame da Enolase Neurônio-Específica para Diagnóstico de Líquido Pleural Maligno e Expressão de Fenótipo Neuroendócrino no Líquido Pleural	62
Tabela 18	Parâmetros Discriminativos com Limiar de Reatividade Igual ou Maior a 28,5 µg/L do Exame da Enolase Neurônio-Específica para Diagnóstico de Líquido Pleural Maligno e Expressão de Fenótipo Neuroendócrino no Líquido Pleural	63
Tabela 19	Predição para Diagnóstico de Líquido Pleural Maligno por Regressão Logística Múltipla	64

LISTA DE FIGURAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Curva ROC representando diversos pontos de corte da NSE-L para diagnóstico de derrame pleural maligno	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA-L – adenosina desaminase no líquido pleural
AUC – área sob a curva ROC
BAAR – bacilo álcool ácido resistente
CEA – antígeno carcinoembrionário
DLH – desidrogenase láctica
DNA – ácido desoxirribonuclêico
DOR – *Diagnostic Odds Ratio*
EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*
ELISA – *enzyme – linked immunosorbent assay*
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HUAP – Hospital Universitário Antônio Pedro
IC 95 % - intervalo de confiança com 95% de probabilidade
IDCG – imunodeficiência combinada grave
INCA/MS – Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde
 κ - indicador kappa
KOH – hidróxido de potássio
LR⁻ - razão de verossimilhança negativa
LR⁺ - razão de verossimilhança positiva
NaF – fluoreto de sódio
NSE – enolase neuro-específica
NSE - L – enolase neuro-específica pleural
OR – *odds ratio*
PCR – reação de cadeia da polimerase
RNA – ácido ribonuclêico/m-RNA – ácido ribonuclêico mensageiro
ROC – *receiver operating characteristic curve*
TEP – Tromboembolismo pulmonar
TRF – imunofluorometria a tempo resolvido
VPN – valor preditivo negativo
VPP – valor preditivo positivo

I – INTRODUÇÃO

1. CONCEITO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Após a fecundação, a partir de uma única célula, um novo indivíduo é formado. Das primeiras divisões celulares, com a formação do embrião até a morte, o organismo passa por vários processos em seu desenvolvimento; dentre eles, a diferenciação celular, que está presente todo o tempo de sua vida (ALBERTS, 2002).

A diferenciação celular é o processo pelo qual as células de um organismo começam a se tornar diferentes em sua forma, composição e função. A partir de então, surgem no indivíduo populações de células distintas, formando estruturas, órgãos e sistemas que interagem entre si e desempenham as diversas funções necessárias à sua sobrevivência (ALBERTS, 2002).

A diferenciação celular inicia-se com a formação de seres multicelulares a partir de colônias unicelulares. Este processo ocorre gradualmente durante a evolução e se repete de forma controlada durante a embriogênese. Graças à diferenciação obtém-se a setorização de funções em organismos multicelulares (ITO et al., 2003).

Durante a diferenciação celular ocorrem modificações químicas e morfológicas com aumento da complexidade celular. Diferenciação equivale a grau de especialização com potencialidade e capacidade de gerar outros tipos celulares. Células diferenciadas não se dividem ou se dividem muito pouco. Um bom exemplo são as células nervosas e musculares cardíacas que apresentam um elevado nível de especialização (ITO et al, 2003)

2. CONCEITO DE DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA

O termo neuroendócrino tem sido usado para definir células que secretam seus produtos de uma maneira regulada ou dirigida em resposta a estímulos específicos. O

sistema neuroendócrino inclui neurônios e células endócrinas, compartilhando um programa fenotípico comum, caracterizado pela expressão de diversos marcadores (DAY e SALZET, 2002).

Características neuroendócrinas têm sido usadas como evidência de uma origem embrionária comum para células normais e neoplásicas. Entretanto, atualmente, é reconhecido que características neuroendócrinas podem ser observadas em vários tipos celulares, tais como os imunócitos, que não têm uma origem embrionária como neurônios ou células endócrinas (DAY e SALZET, 2002; SALZET 2002; SALZET e DAY, 2003).

DAY E SALZET propõem redefinir o conceito neuroendócrino para incluir a noção de ativação ou transferência genética específica que conduz à expressão de um fenótipo neuroendócrino em uma variedade de tipos celulares, incluindo às células do sistema imune ((DAY e SALZET, 2002; SALZET 2002; SALZET e DAY, 2003; TONI, 2004).

As considerações mencionadas conduzem ao termo “sistema neuroimunoendócrino”, cuja ação e interação está sendo objeto de estudo e pesquisa por parte do autor deste trabalho e seus colaboradores.

3. INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS NERVOSO, IMUNE E ENDÓCRINO (SISTEMA NEUROIMUNOENDÓCRINO)

Ao longo das últimas décadas tem sido observada a síntese de peptídeos e aminas biogênicas por diferentes células constituintes do sistema neuroimunoendócrino (KVETNOY, 2002).

Historicamente, com base em uma série de experimentos, PEARSE (1969) sugeriu a existência de um sistema de células altamente organizado com capacidade secretora e distribuído por todo organismo. PEARSE demonstrou que tal sistema tem a habilidade de captar precursores de monoaminas e fazer a sua descarboxilação. Esta habilidade levou

tal autor ao termo APUD, já amplamente divulgado, uma abreviatura para "*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*" (KVETNOY, 2002).

O sistema APUD inclui atualmente mais de 60 tipos de células endócrinas localizadas no intestino, pâncreas, trato urogenital, epitélio das vias aéreas, glândula pineal, glândulas tireóide, adrenal, adenohipófise e hipotálamo, corpo carotídeo, pele, gânglios simpáticos, timo, placenta e outros órgãos (KVETNOY, 2002).

A percepção que se tem da homeostasia tecidual hoje indica que haja uma grande interação entre os diferentes sistemas que compõem o sistema neuroimunoendócrino (KVETNOY, 2002).

Assim, torna-se cada vez mais evidente que os mecanismos da regulação biológica atualmente são baseados em uma coordenação e interação funcional entre o sistema endócrino e o sistema nervoso central e periférico. (KVETNOY, 2002).

As ações do sistema neuroimunoendócrino ocorrem de forma, preferencialmente, humoral onde moléculas iguais ou similares orquestram respostas em todo o organismo, constituindo um sistema neuroimunoendócrino difuso (KVETNOY, 2002).

Muitos estudos comprovam a identificação das mesmas e similares substâncias com funções iguais atuando dentro do sistema nervoso como neurotransmissores e neurohormônios, e localmente ou remotamente como hormônios, sendo capazes de incorporar todos os sistemas em um sistema neuroimunoendócrino difuso (DNIES).

WEIGENT e BLALOCK, em 1997, demonstraram que a comunicação e regulação recíproca entre os sistemas nervoso, endócrino e imune são essenciais para a estabilidade dos organismos, uma vez que interagem utilizando como mediadores químicos as mesmas moléculas sinalizadoras.

Modelos animais diversos têm sido utilizados, nos últimos anos, para estudar os mecanismos neuroimunes, confirmando o elo de comunicação (interação) entre o sistema

neuroendócrino e o imune, via neuropeptídeos e através de receptores específicos (SALZET, 2002).

A cavidade pleural pode ser pesquisada, experimentalmente, e suas interações imunes estudadas a partir de doença local pré-determinada. O camundongo é um modelo animal confiável e prático para estudo da cavidade pleural e oferece uma definição precisa dos mecanismos locais de imunidade (PEAO et al., 1992).

4. MARCADORES MOLECULARES NEURAIS E DE CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS

Marcadores moleculares neurais e de células neuroendócrinas podem ser classificados de acordo com suas localizações nos diferentes compartimentos das células.

A tabela 1 resume a localização e os diferentes marcadores moleculares das células neuroendócrinas (LANGLEY, 1994; ADRIAENSEN e SCHEUERMANN, 1993).

Tabela 1 – Marcadores Moleculares para Células Neuroendócrinas

LOCALIZAÇÃO CELULAR	EXEMPLOS
CITOPLASMA	Ácido L-Amino descarboxilase (AADC) Acetil colinesterase (AChE) Enolase neurônio específica (NSE) <i>Protein gene product (PGP) 9.5</i>
GRÂNULOS	Hormônios peptídeos Cromograninas A, B Secretogranina II (cromogranina C) Carboxipeptidase H
MEMBRANAS DE VESÍCULAS SECRETÓRIAS	Citocromo b-561 Aminas transportadoras Synaptofisina P65/synaptogranina Synaptobrevina/VAMP SV 2
MEMBRANA PLASMÁTICA	Receptores para peptídeos, neurotransmissores (somatostatina, GABA, glicina, glutamato) Receptores para toxina tetânica, A2B5 e moléculas adesão da célula neural (NCAM, L 1)

Fonte: Langley, 1994; Adriaensen e Scheuermann, 1993

A maioria dos marcadores apresentados na tabela 1 estão presentes em neurônios e muitas vezes são característicos destas células (LANGLEY, 1994).

5. CÉLULAS PULMONARES NEUROENDÓCRINAS

As células pulmonares neuroendócrinas (PNECs) também são chamadas de células de Kulchitsky (Nicholas Kulchitsky, 1856 – 1925). Estão presentes nos brônquios normais e epitélio respiratório bronquiolar junto à membrana basal da mucosa nos homens e de outros animais (BOERS et al., 1996).

As PNECs possuem reatividade imuno-histoquímica e ultraestrutura semelhante à dos tumores neuroendócrinos. Acredita-se que são estas células que dão origem aos carcinomas neuroendócrinos do pulmão. Suas principais características são:

a) HISTOQUÍMICA

Reação argentáfrica (Fontana-Masson) e reação argirofílica (Grimelius).

b) IMUNO-HISTOQUÍMICA

Marcadores neuroendócrinos: cromogranina A e enolase neurônio específica (NSE) são os marcadores imuno-histoquímicos mais sensíveis para identificação. Marcadores epiteliais (exemplos: pan-queratina; cam 5.2; AE1/AE3) e marcadores hormonais específicos (ACTH; calcitonina; insulina; entre outros).

c) EMBRIOGÊNESE

No feto as PNECs ocorrem como *clusters* – corpos neuroepiteliais – que são inervados. O número dessas células não difere entre os neonatos e os adultos. Ocorrem sobre as carinas em maior número do que nas paredes laterais dos brônquios (AVADHANAM et al., 1997).

A origem endodérmica destas células é aceita, uma vez que ocorrem no epitélio fetal imaturo (ITO, 2003).

Carcinomas neuroendócrinos do pulmão são derivados das células neuroendócrinas brônquicas (ITO, 2003). Compreendem 20% dos carcinomas brônquicos (GUSTAFSSON et al., 2008).

d) FISILOGIA

As PNECs pertencem ao sistema neuroendócrino difuso (DNES) porque possuem fenótipos endócrino e neurônio específicos (ITO, 2003).

No feto de coelhos, um mecanismo sensor para oxigênio tem sido observado e, assim como nos corpos carotídeos, uma função das PNECs pode ser de quimiorreceptores (YOUNGSON et al., 1993).

Em feto de ratos, o marcador neuroendócrino bombesina (semelhante ao peptídeo liberador de gastrina das PNECs dos mamíferos) tem mostrado ser um estimulante das

ramificações brônquicas em cultura, sugerindo a importância dessas células no desenvolvimento do pulmão (KING et al., 1995). Os peptídeos semelhantes à bombesina (“bombesin-like-peptides” – BLP) são potentes fatores de crescimento, assim como ativadores de células imunes.

e) HIPERPLASIA

Em certas condições, essas células podem apresentar hiperplasia confinada ao epitélio brônquio como resposta à injúria pulmonar.

A hiperplasia das PNECs foi encontrada nas seguintes condições: displasia broncopulmonar neonatal (SHENBERGER et al., 1997); hérnia diafragmática congênita em recém-nascidos (IJSSELSTIJN et al., 1997); fumantes e moradores de grande altitude (AGUAYO et al., 1992); hipertensão pulmonar primária (HEATH et al., 1987); tumor carcinóide (MILLER e MULLER, 1995); fibrose cística; asma; panbronquiolite; exacerbação da bronquite crônica; enfisema pulmonar em adultos e crianças (ALSHEHRI et al., 1997); granuloma eosinofílico, transplante de pulmão e doença fibrótica do pulmão (AGUAYO et al., 1992).

Em 1994, AGUAYO formulou uma hipótese sobre a diferença de sensibilidade entre indivíduos para desenvolver obstrução crônica das vias aéreas. Outras doenças pulmonares relacionadas com o tabagismo talvez estejam vinculadas com as células pulmonares neuroendócrinas. Na hipótese de AGUAYO, as diferenças individuais estariam na função ou número destas células presentes na árvore traqueo-brônquica dos indivíduos.

6. MECANISMOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS PULMONARES NEUROENDÓCRINAS

A informação genética contida no DNA controla a diferenciação celular. A célula-ovo possui toda a informação necessária e possui todas as funções que caracterizam as

células diferenciadas. Células especializadas perdem a capacidade de expressar a maior parte da informação contida no seu DNA (ITO et al., 2003).

A diferenciação resulta de uma série de expressões gênicas controladas (ITO et al., 2003).

Durante a diferenciação pode ocorrer os seguintes fenômenos: ativação de genes e inativação de outros; síntese de m-RNA (alguns são transcritos e outros não); transformação reversível do epitélio ciliado das vias respiratórias em epitélio estratificado pavimentoso (carência de vitamina A, por exemplo); entre outros (ITO et al., 2003).

Pode-se apontar os seguintes fatores que controlam a diferenciação celular (ITO et al., 2003):

a) Extrínsecos

Exemplos: físicos (raios X, temperatura, radioatividade); químicos (drogas, substâncias poluentes).

b) Intrínsecos

Se encontram nas células em diferenciação. Instrução pré-programada do DNA.

Como primeiro passo para entender a diferenciação celular, ALBERTS e colaboradores (2002) fazem certas observações gerais. Uma delas é que “algumas proteínas são abundantes nas células especializadas nas quais elas atuam e não podem ser detectadas em nenhum outro local, mesmo por testes sensíveis. A hemoglobina, por exemplo, pode ser detectada somente nas células vermelhas do sangue”.

As células que compreendem o sistema neuroendócrino difuso parecem exigir fatores de transcrição semelhantes para expressar proteínas neuroendócrinas comuns durante o processo de diferenciação. Os seguintes grupos de fatores de transcrição têm sido relatados como envolvidos neste processo (ITO et al, 2003): *Pit1-Oct2-Unc86 (POU)*, *basic-helix-loop-helix (bHLH)*, *zinc finger* e *homeodomains*.

7. DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA DO CARCINOMA BRÔNQUICO E MECANISMOS DE DIFERENCIAÇÃO DO CARCINOMA BRONQUICO DE PEQUENAS CÉLULAS

O carcinoma brônquico é o que se manifesta com maior frequência nos indivíduos e tem sido demonstrado um aumento anual de 2% em sua incidência mundial. Infelizmente, até o presente momento sua letalidade se mantém elevada. No Brasil, é a principal causa de morte oncológica entre os homens e a segunda entre as mulheres (INCA/MS, 2008). Nos Estados Unidos, é a principal causa de morte por câncer tanto em homens quanto em mulheres (INCA/MS, 2008).

Segundo o INCA (2008), clinicamente, os carcinomas brônquicos são classificados em dois grandes grupos devido a diferentes comportamentos biológicos e prognósticos: carcinoma de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) e carcinoma de pulmão de células pequenas (SCLC).

Dentre os tipos de SCLC, destaca-se o carcinoma indiferenciado de pequenas células, com três subtipos celulares: o linfocitóide (oat cell), o intermediário e o combinado (de células pequenas mais carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma), segundo a WHO (1999) e o INCA (2008).

Cerca de 75% dos SCLCs têm fenótipo neuroendócrino (CAPELOZZI et al., 2002). Isto implica em melhor resposta em tratamento de quimioterapia e radioterapia destes pacientes (SILVA JUNIOR e CARDOSO, 2003).

O NSCLC é o mais freqüente com prevalência entre 75% e 80% de todos casos (GINSBERG et al., 1997). As doenças malignas são exemplos de causas freqüentes de derrame pleural exsudativo. Carcinomas broncogênicos do tipo NSCLC (especialmente os adenocarcinomas), linfomas e carcinoma de mama, constituem, em várias séries publicadas na literatura, 75,0% das causas de derrame pleural maligno (NEVES et al., 2001).

Carcinomas de não-pequenas células apresentam heterogeneidade fenotípica, sendo a cura e a sobrevida associadas à sua ressecabilidade. Por esta razão, a subclassificação precisa do tipo celular é menos importante do que o diagnóstico de carcinoma broncogênico de pequenas células e carcinoma broncogênico de não pequenas células (CIBAS e DUCATMAN, 1996). Alguns estudos da literatura têm mostrado que o fenótipo neuroendócrino associa-se a uma melhor resposta à quimioterapia e melhora na sobrevida nos pacientes com carcinoma pulmonar de células não-pequenas. Por sua vez, o desenvolvimento da técnica imuno-histoquímica permitiu comprovar que uma parcela dos carcinomas brônquicos de células pequenas, que apresentam diferenciação neuroendócrina, são mais agressivos e com disseminação mais precoce que os não-endócrinos (GAZDAR, 1992; SILVA JUNIOR e CARDOSO, 2003).

O fenótipo neuroendócrino é tipicamente definido como expressão de marcadores listados na tabela 2, pela técnica de imuno-histoquímica. Por essa definição, 75% dos SCLC e 20 a 25% dos NSCLC têm fenótipo neuroendócrino.

Pela análise da tabela 2, observa-se estatisticamente que a enolase neurônio específica é o marcador mais sensível para expressar o fenótipo neuroendócrino dos carcinomas broncogênicos.

Tabela 2 – Imuno-Histoquímica dos Marcadores de Diferenciação Neural (Neuroendócrinos) em Câncer Brônquico

MARCADORES	SCLC	NSCLC
L-dopa descarboxilase	48 – 82%	12 – 33%
Cromogranina A	48 – 93%	0 – 28%
Enolase neurônio específica	93 – 100%	27 – 57%
Bombesina	20 – 69%	1- 17%
Sinaptofisina	43 – 88%	10 – 28%
Leu-7	59 – 89%	16 – 44%

SCLC: CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS PEQUENAS; **NSCLC:** CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS

FONTE: Capelozzi et al., 2002

A enolase neurônio-específica e outros marcadores neuroendócrinos são marcadores potenciais para acompanhar o curso clínico de pacientes com câncer pulmonar de pequenas células (TAKAGAKI et al., 1992; SILVA JUNIOR e CARDOSO, 2003).

Além dos marcadores enzimáticos neurais, o SCLC produz uma grande variedade de hormônios peptídeos que podem levar a síndromes paraneoplásicas (SILVA JUNIOR e CARDOSO, 2003).

A arginina vasopressina (AVP) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), são responsáveis por síndromes clínicas paraneoplásicas. Outros exemplos: calcitonina, gastrina, peptídeo liberador de gastrina (bombesina), hormônio do crescimento, oxitocina, fislalaemina e somatostatina (SILVA JUNIOR e CARDOSO, 2003).

Em relação às superfícies pleurais, raramente, as células mesoteliais são positivas na imuno-histoquímica para enolase neurônio específica (HURLIMANN, 1994).

A diferenciação neuroendócrina no SCLC parece ser regulada por uma rede de fatores de transcrição bHLH e seus moduladores, conforme resumo na tabela 3.

Tabela 3 – Fatores de Transcrição que Regulam a Diferenciação Neuroendócrina no Carcinoma de Pulmão de Pequenas Células

FATOR DE TRANSCRIÇÃO	FAMÍLIA	FUNÇÃO
HASH 1	BHLH	Estimulação
Hes 1	BHLH	Repressão
L-Myc	bHLH-Zip	Estimulação
<i>Scratch</i>	<i>Zinc finger</i>	Modulação

Fonte: ITO et al., 2003

8. IMPORTÂNCIA DAS ENZIMAS PARA O DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Todo o funcionamento dos organismos vivos, em todas as etapas de suas vidas, depende de múltiplos e eficientes mecanismos de sinalização química (ALBERTS, 2002).

Uma das propriedades dos seres vivos que faz com que eles pareçam diferentes da matéria não-viva é que eles criam e mantêm a ordem em um universo que está sempre tendendo à desordem. A ordem dos organismos vivos depende de uma série de reações químicas que nunca termina. Entretanto, muitas destas reações ocorrem lentamente para manter os processos vitais (ALBERTS, 2002).

As ações catalíticas estão na dependência de enzimas que aceleram os processos vitais. Essas reações estão presentes desde vírus até os mamíferos superiores. Nestes últimos, encontramos enzimas em todos os tecidos e líquidos orgânicos (ALBERTS, 2002).

No diagnóstico do envolvimento de um órgão específico numa doença, seria ideal se houvessem enzimas particulares para cada órgão que pudessem ser identificadas.

Entretanto, isto não é factível porque os processos metabólicos de vários órgãos são muito semelhantes. Contudo, existem enzimas específicas para um determinado órgão ou tecido. Exemplos são a álcool desidrogenase do fígado e a fosfatase ácida da próstata (BOYER, 1971).

O estudo da cinética do aparecimento e desaparecimento de enzimas particulares no plasma, devido a diversos mecanismos patogênicos, permite que o diagnóstico da doença de um órgão específico seja realizado (ALBERTS, 2002).

9. ENOLASE NEURÔNIO ESPECÍFICA (NSE)

Descrita inicialmente, em 1965, por MOORE e MCGREGOR, como enzima catalisadora da via glicolítica anaeróbia, a enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) se encontra distribuída em todos os tecidos dos mamíferos (MOORE e Mc GREGOR, 1965).

A função da enolase na via glicolítica é a desidratação do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Esta é a segunda reação da sequência glicolítica da qual é gerado composto fosfatado de alta energia. Esta reação é catalisada pela enzima enolase e consiste da remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato com a produção de fosfoenolpiruvato.

A enolase possui massa molecular de 85.000 Da. A sua atividade pode ser inibida por fluoreto (F⁻) e fosfato (HENRY, 1995).

No sistema nervoso central, podemos detectar três tipos de isoenzimas da enolase: alfa-alfa, alfa-gama e gama-gama.

A isoenzima alfa-alfa (alfa-enolase ou enolase não neuronal) é a forma mais comumente encontrada de enolase, sendo localizada na maioria dos tecidos.

A subunidade beta (beta-enolase) acha-se predominantemente no tecido muscular estriado e no coração (HENRY, 1995).

A subunidade gama (gama-enolase) possui configuração idêntica à da proteína cérebro-específica 14-3-2 isolada do cérebro bovino por MOORE e a partir daí as isoenzimas alfa-gama e gama-gama foram caracterizadas como enolase neurônio-específica – NSE com código: 4.2.1.11 e também denominada de gama enolase (MARANGOS et al., 1977).

Em 1978, SCHMECHEL e colaboradores detectaram enolase neurônio-específica na pineal, hipófise, tireóide, medula adrenal e pâncreas, citando-a como marcador molecular para as células neuroendócrinas centrais e periféricas. Nesse mesmo trabalho, os autores antevêm o futuro e especulam que a enolase neurônio-específica possa vir a ser útil no diagnóstico e monitoramento do tratamento dos tumores do sistema APUD, hoje denominados tumores neuroendócrinos. Com técnicas imuno-enzimáticas altamente sensíveis, níveis significativos da isoenzima alfa-gama foram verificados em tecidos não neuroendócrinos, como musculatura lisa, tecido fibromuscular, células epiteliais brônquicas e pneumócitos tipo II (HAIMOTO et al., 1985).

A utilização da enolase neurônio específica como marcador tumoral do pulmão começa a partir dos trabalhos de COLE e colaboradores (1980). Estes a descrevem como marcador histoquímico das células pulmonares que tenham diferenciação neuroendócrina na tentativa de correlacionar o pulmão como membro do sistema APUD.

Em 1981 constatou-se, por imuno-histoquímica, a presença de níveis elevados de enolase neurônio-específica em tumores neuroendócrinos, como glucagonoma, insulinoma, carcinóide de intestino, feocromocitoma e carcinoma medular da tiróide (TAPIA et al., 1981).

Em seguida, em 1982, verificou-se sua presença no neuroblastoma e ocorre a correlação entre a enolase neurônio específica e carcinoma de pulmão de pequenas células (MARANGOS et al., 1982).

Naquele mesmo ano, CARNEY e colaboradores publicaram um trabalho em que consideram a enolase neurônio específica como marcador de doença extensa e como forma de avaliação da resposta terapêutica no carcinoma de pequenas células (CARNEY et al., 1982).

Em 1984 foi sugerido que a NSE seja um marcador tumoral útil, assim como método auxiliar de estadiamento (estando significativamente mais elevada na doença extensa), monitor terapêutico e preditor de recidiva de doença nos pacientes com carcinoma de pequenas células tratados (JOHNSON et al., 1984).

Assim, a determinação sérica da enolase neurônio específica parece ser um instrumento valioso para o diagnóstico do carcinoma de pequenas células, combinando aceitável sensibilidade com alto grau de especificidade (ESSCHER et al., 1985).

10. MÉTODOS DE DOSAGEM DA ENOLASE NEURONIO ESPECÍFICA

a) ELISA

A dosagem sérica da NSE por ELISA tem provado ser um valioso instrumento no auxílio diagnóstico do carcinoma de pulmão de pequenas células, com sensibilidade global variando entre 60% e 85% (média de 77,5%) e especificidade variando entre 85% e 95% (média de 90%). Vale lembrar que a sensibilidade é fortemente correlacionada com o estágio de doença, podendo na doença limitada variar entre 32,5% e 68% (média 50,3%) e de 78,6% e 100% (média 89,2%) na doença extensa (AKOUN et al., 1985).

Considerando que pacientes com derrame pleural maligno já possuem extensão de sua doença para a cavidade pleural, estima-se uma maior sensibilidade do exame da NSE no líquido pleural do que no soro desses pacientes. Isto porque as células malignas, presentes no líquido pleural, secretariam a enzima em uma cavidade fechada sem chances de grandes diluições do marcador pelo organismo.

b) IMUNO-HISTOQUÍMICA

Um conjunto de treze anticorpos em 473 casos de NSCLC foram avaliados por ULBRICH-KULCZYNSKI (1997) através da técnica de imuno-histoquímica. Três deles marcadores tumorais gerais: antígeno cárcino-embriônico, gonadotrofina coriônica e glucagon; dois marcadores neuroendócrinos: enolase neurônio - específica e cromogranina A e oito produtos secretórios: hormônios adrenocorticotrófico, tireotrófico, luteinizante, folículo-estimulante, do crescimento, prolactina, serotonina e insulina.

A prevalência para marcadores neuroendócrinos ou produtos secretórios isolados foi de 44,8% dos casos e para dois marcadores positivos em 22,8%.

A prevalência de antígeno cárcino-embriônico foi de 94,7%, de glicoproteínas placentárias 18,2% e do glucagon 8,0%.

A expressão do fenótipo neuroendócrino na casuística de ULBRICH-KULCZYNSKI foi avaliada somente em tecido pulmonar. Um objetivo geral para novas pesquisas seria estudar se a morfologia celular e expressão de marcadores neuroendócrinos são os mesmos para líquido pleural e tecido pulmonar em pacientes com carcinoma brônquico e derrame pleural maligno concomitante.

C) FLUOROMETRIA POR TEMPO RESOLVIDO

A fluorometria de resolução de tempo (TRF) é a chave para otimizar a sensibilidade da análise.

Alguns fabricantes incluem uma vasta seleção de kits reagentes de TRF para pesquisadores e médicos que trabalham em áreas como a endocrinologia, oncologia, assim como na hematologia (INNOTRAC DIAGNOSTICS, 2003).

A fluorometria de resolução de tempo não possui nenhuma comparação com a medição de fluorescência imediata.

Não foi encontrada na literatura pesquisada dosagem de NSE por TRF no líquido pleural.

Um trabalho apenas menciona dosagem da NSE, no soro, de pacientes com câncer brônquico por TRF e a sensibilidade é maior quando comparada com a técnica de ELISA isoladamente (PAN et al., 2002).

Outra pesquisa sobre fluorometria por tempo resolvido conclui que o exame tem precisão excelente (aproximadamente 4 %), além de ser sensível e possuir rapidez de dosagem com automação (CHRISTOPOULOS e DIAMANDIS, 1992).

11. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O carcinoma brônquico, neoplasia agressiva e letal, vem representando grande desafio para os oncologistas, uma vez que, apesar de todos os avanços diagnósticos e terapêuticos, a taxa de sobrevivência global em cinco anos permanece inalterada em 13% ao longo das últimas décadas (GINSBERG et al., 1997).

A síndrome do derrame pleural faz parte do processo de disseminação do câncer brônquico e de outros tipos de câncer (NEVES et al., 2001).

Considerando ser o reconhecimento das sub-populações do câncer pulmonar de importância prognóstica, a possibilidade de influências geográficas na manifestação de seu fenótipo e associados à ausência de estudos no país da diferenciação neuroendócrina no líquido pleural, foi decidido analisar esta diferenciação em nosso meio através dos parâmetros diagnósticos na síndrome do derrame pleural.

A proposta desta pesquisa vem ao encontro da nossa experiência prévia em pesquisas clínicas pioneiras no Brasil realizadas com o Professor Dr. Roberto Paes de Carvalho e Prof. Aloysio Veiga de Paula, na Universidade Federal Fluminense, com a enzima adenosina desaminase dosada quantitativamente pelo método colorimétrico de Martinek (SILVA JUNIOR, 1987).

O trabalho atual teve como um dos objetivos avaliar a importância de outra enzima (enolase neurônio - específica) para o diagnóstico diferencial na síndrome do derrame pleural, possibilitando a ampliação de seu estudo no líquido pleural para a área da Neuroimunologia.

A enzima enolase neurônio - específica (NSE) foi escolhida para diagnóstico de diferenciação neuroendócrina (expressão do fenótipo neuroendócrino) no líquido pleural (NSE-L) porque é o marcador tumoral mais sensível para distinguir carcinomas brônquicos neuroendócrinos de outros tipos de carcinomas brônquicos, além de diferenciar os seus mimetizadores mais frequentes no diagnóstico histopatológico convencional que são os carcinomas de mama e os linfomas (BANNER et al, 1986).

De acordo com ADRIAENSEN e SCHEUERMANN (1993), “a ocorrência de NSE deve ser o mais seguro parâmetro para a identificação de células neuroendócrinas em materiais sadios e tecidos pulmonares doentes”.

Além dessas considerações, vale lembrar que, na prática, o diagnóstico definitivo dos quatro grandes grupos de carcinoma brônquico em pequenas amostras de tecidos, tais como das resultantes de biópsias pleurais abertas, fechadas com agulha e transbrônquica, ainda permanece um desafio mesmo para patologistas mais experientes (FLIEDER, 2002).

Cabe ressaltar novamente que 75% das causas de derrame pleural maligno são devidas ao câncer brônquico, linfomas e carcinoma de mama (LIGHT, 1995; NEVES et al., 2001).

A justificativa maior para tal estudo é avaliar a utilidade na prática clínica de um marcador tumoral neuroendócrino no diagnóstico diferencial da síndrome do derrame pleural.

II – OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo, em uma série de pacientes portadores de síndrome do derrame pleural, foram:

1 – OBJETIVO GERAL:

Contribuir com o estudo da enzima enolase neurônio-específica pleural (marcador de diferenciação neuroendócrina) utilizando sua dosagem para diagnóstico diferencial entre derrame (líquido) pleural benigno e maligno através do método de imunofluorometria a tempo resolvido.

2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.1 - Determinar, estatisticamente, na casuística pesquisada, o limiar crítico discriminativo com eficiência máxima do exame da enzima enolase neurônio específica para o diagnóstico de líquidos pleurais malignos;

2.2 – Definir os parâmetros de padronização e discriminação do teste da enolase neurônio específica no líquido pleural, no limiar crítico discriminativo determinado, dosada, quantitativamente, pelo método de imunofluorometria a tempo resolvido, para o diagnóstico de derrame pleural maligno;

2.3 – Descrever qual tipo histológico com líquido pleural maligno metastático foi o mais freqüente na casuística estudada;

2.4 – Avaliar em modelo de análise multivariada, por regressão logística múltipla, os fatores preditivos para derrame pleural maligno. Modelar como variável dependente a classificação da síndrome do derrame pleural (benigna ou maligna) e como variáveis independentes o resultado do exame da enolase neurônio específica em líquido pleural, a idade e o sexo dos pacientes.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. ROTEIRO UTILIZADO PARA INVESTIGAÇÃO DA CAUSA DA SÍNDROME DO DERRAME PLEURAL (PLEUROGRAMA)

O pleurograma era constituído dos exames mínimos necessários, no soro e no líquido pleural, para esclarecimento da causa da síndrome de derrame pleural.

Antes da realização dos procedimentos e exames do pleurograma, cada paciente foi submetido a uma acurada história clínica e avaliação imagética. Antes de cada procedimento, o paciente foi instruído de sua natureza e benefícios.

Cada material antes de transportado para o laboratório, foi armazenado e antes da realização dos exames, foi caracterizado quanto à data e procedimento de obtenção, acompanhado de dados clínicos, identificação do paciente, idade, sexo, data do início e evolução da doença, história terapêutica e condições mórbidas associadas.

Cada material foi enviado ao laboratório, em frasco esterilizado, bem vedado, e em menor espaço de tempo possível. O material, quando necessário, foi transportado sob refrigeração, embora dados de literatura provem, estatisticamente, que líquido pleural pode ficar por vinte e quatro horas em temperatura ambiente, porém, apenas para exames bioquímicos (MORRONE et al., 1996).

A) MATERIAL: SORO

No soro, assim como no líquido pleural, foram realizados os seguintes exames bioquímicos: glicose, desidrogenase láctica (DLH), proteínas totais e albumina. Esses exames são incluídos no pleurograma convencional porque fazem parte de critérios bioquímicos para classificar líquido pleural transudativo ou exsudativo (LIGHT et al., 1972). Colesterol total, bilirrubina total e outros exames descritos na literatura não foram considerados devido ao rendimento estatístico inferior quando comparados com o critério de LIGHT (HEFFNER, 1998).

Quando tais exames não podiam ser realizados, dentro de 24 horas, o soro era retirado do refrigerador e estocado em *freezer* a – 20 graus C.

A dosagem de glicose foi realizada em frasco estéril com três gotas de fluoreto de sódio (NaF) para 2 mL de material puncionado. Método utilizado: sistema enzimático de peróxido oxidase (HENRY, 1995).

A dosagem de DLH foi realizada pelo método de Whitaker modificado (HENRY, 1995).

A dosagem quantitativa de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico de ponto final (HENRY, 1995).

A dosagem da quantidade de albumina foi realizada pelo método de verde de bromocresol (HENRY, 1995).

B) MATERIAL: LÍQUIDO PLEURAL

As amostras foram retiradas dos pacientes, através do procedimento de toracocentese, com agulha de calibre 16, após tricotomia (quando indicado), antissepsia ampla da pele do hemitórax com éter e posteriormente aplicação de álcool iodado. A seguir anestesia local da pele, subcutâneo, periósteo da costela adjacente, músculos intercostais, nervos subcostais e pleura parietal, no local delimitado por campos esterilizados (ERNST et al., 2003).

A anestesia local da toracocentese e biópsia pleural parietal foram realizadas por infiltração, inicialmente com pequeno botão anestésico e sempre precedida de aspiração do êmbolo da seringa, a fim de evitar sua introdução na corrente sanguínea. Nunca foi ultrapassada a dose máxima de 200 mg de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, para adultos com peso de aproximadamente 70 kg, através de agulha calibre 21 (ASTRON, 1987).

Local da toracocentese: interseção de uma linha horizontal, passando pela base do apêndice xifóide, com uma linha vertical passando pela linha axilar média ou linha axilar

posterior ou linha paravertebral do hemitórax correspondente ao derrame pleural, com o paciente sentado na mesa cirúrgica. A linha axilar posterior foi o local escolhido nos derrames volumosos diagnosticados pelo exame de imagem.

Nos casos de derrames volumosos, tanto após toracocentese ou biópsia pleural, foi realizado o esvaziamento quase máximo da cavidade pleural.

Ocasionalmente, e, sobretudo, nos casos sugestivos de fibrotórax ou derrame pleural encistado, o local da toracocentese foi orientado pela ultra-sonografia pleural (ERNST et al., 2003).

a) EXAMES BIOQUÍMICOS

Os exames bioquímicos no líquido pleural foram os mesmos realizados no soro, após centrifugação em macro-centrífuga a 1200 rpm.

Quando tais exames não podiam ser realizados dentro de 24 horas, o líquido pleural centrifugado era retirado do refrigerador e estocado em *freezer* a – 20 graus C.

Todos os exames de bioquímica, no soro e no líquido pleural, mencionados anteriormente, com exceção da determinação de glicose, foram realizados em frasco seco, estéril e sem anticoagulante, no Laboratório de Patologia Clínica do HUAP. Existe na literatura um trabalho provando, estatisticamente, que não é necessária colocação de NaF no frasco para dosagem de glicose no líquido pleural, assim como, não há necessidade de ressuspensão do coágulo para dosagem de proteínas (MORRONE et al., 1996).

b) MARCADORES TUMORAIS

No pleurograma convencional, foi dosado o antígeno carcinoembrionário (CEA) pelo método de ELISA. O autor tem grande experiência clínica e laboratorial com este marcador (BRAGA, 1990; SILVA JR et al., 2004). O exame foi realizado em frasco seco, estéril e sem anticoagulante, no Laboratório de Imunopatologia do HUAP.

c) EXAMES DE MICROBIOLOGIA

Exame direto para pesquisa de BAAR. Método: técnica de coloração de Kinyoun, em líquido pleural citocentrifugado. Exame realizado no IBAC - Laboratório Médico Ltda.

Cultura de Micobactérias. Método convencional. Cultura realizada em meio sólido de Loewenstein e Jensen, em líquido pleural heparinizado (5 000 UI/10 mL), no momento da colheita para evitar a formação de coágulos, fato esse que aprisionaria os bacilos na rede de fibrina (LEVINE et al., 1970). Exame realizado no IBAC - Laboratório Médico Ltda.

Exame direto para fungos, com uso de KOH a 20%, no Laboratório de Micologia do HUAP. Cultura para fungos. Meios Sabouraud e seletivo para fungos, no laboratório de Micologia do HUAP. Coloração pelo método de Gram; cultura em meios convencionais para bactérias gram positivas e gram negativas; antibiograma com discos contendo antibióticos selecionados e concentrações específicas. Exames realizados no Laboratório de Microbiologia do HUAP.

Para todos os exames de microbiologia, o líquido pleural foi colocado em frascos estéreis contendo 5000 UI de heparina por 10 mL de material puncionado.

d) LEUCOGRAMA e CITOPATOLOGIA PARA CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Leucometria total e diferencial. Método de coloração, com corante de Wright, após colheita do líquido pleural em frascos estéreis, contendo 3 gotas de EDTA por 5 mL de material. Método de contagem: hemocitômetro de Neubauer. Exames realizados no IBAC – Laboratório Médico Ltda.

A identificação de células neoplásicas e mesoteliais foi realizada com coloração pela técnica idealizada, em 1942, para citologia exfoliativa do Dr. George N. Papanicolau, após fixação, no laboratório, em álcool etílico a 95%, do líquido pleural citocentrifugado ou macrocentrifugado (PAPANICOLAU, 1963). A colheita do material foi realizada em frascos estéreis, contendo 5000 UI de heparina por 5 - 10 mL de material. Para proteção das amostras, no momento da colheita até serem enviadas ao laboratório, não foi utilizado como pré-fixador o álcool etílico a 50%.

A citopatologia do líquido pleural incluiu a análise de células naturalmente descamadas das superfícies pleurais, sendo avaliadas pelo seu aspecto morfológico, e definidos padrões (critérios) de normalidade e alterações indicativas da existência de processos inflamatórios ou neoplásicos.

Os seguintes critérios foram utilizados para diferenciar células cancerosas e células normais (MURPHY et al., 1996): menores necessidades de fatores de crescimento; alguns sinais de diferenciação; imortalidade; estrutura celular alterada (aumento do tamanho do núcleo, incremento da relação núcleo-citoplasma, distribuição irregular da cromatina e presença de nucléolos proeminentes); invasão e produção de metástases.

Os exames de citopatologia foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do HUAP.

e) ADENOSINA DESAMINASE

Material armazenado em frasco seco, estéril e sem anticoagulante.

Exame da ADA realizado no líquido pleural centrifugado, após descarte da celularidade, reservado no refrigerador por no máximo 24 horas ou estocado no *freezer* a - 20 ° C.

A dosagem de atividade da enzima foi realizada pelo método colorimétrico de Giusti e Galanti (1974), cujo *kit* foi pesquisado, desenvolvido e manipulado artesanalmente *in house* pela equipe do Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural, vinculado à Disciplina de Pneumologia do Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da UFF, a partir dos artigos originais dos autores, com supervisão técnica do autor.

f) EXAMES ESPECIAIS

Os exames considerados especiais foram realizados sempre que necessários, no líquido pleural, para auxiliar no diagnóstico. Tiveram o propósito de confirmar a causa de

uma determinada doença não muito freqüente no Ambulatório ou para protocolos de projetos de pesquisa sobre síndrome do derrame pleural. Exemplo: marcadores de colagenoses, outros marcadores tumorais que não o CEA e NSE (tais como CYFRA 21-1, CA 125, outros), colesterol total, bilirrubina total, beta-2-microglobulina, pH, amilase, lípase, interferon-gama, fator alfa de necrose tumoral e outros.

Esses exames são realizados em líquido pleural proveniente de um frasco seco, estéril, sem anticoagulantes, contendo líquido pleural centrifugado, identificado e armazenado em *freezer* a - 20 ° C e - 70 ° C.

C) MATERIAL: FRAGMENTOS DE BIÓPSIA DE PLEURA PARIETAL

Material retirado dos pacientes pelo procedimento de biópsia pleural parietal fechada, com agulha técnica reusável, esterilizada antes do uso (tipo Cope); agulha essa de aço inoxidável, marca registrada Becton Dickinson, comprimento 80 mm, calibre 3,0 mm, através de técnica convencional mencionada pioneiramente na literatura, por Cope em 1958. A infiltração anestésica local para o procedimento de toracocentese foi mantida nos pacientes para realização de biópsia pleural fechada (ERNST et al., 2003).

Após realização das biópsias pleurais com agulha de Cope, um curativo oclusivo com pomada contendo antibiótico (neomicina ou cloranfenicol) permanecia por vinte e quatro horas no local da introdução da agulha.

Os fragmentos pleurais obtidos, mínimo de três e máximo de cinco, em um único sítio torácico, foram armazenados em frascos de boca larga, contendo como fixador formol isotônico a 10%.

O exame histopatológico foi realizado somente pelo método convencional com coloração pela hematoxilina-eosina (KOSS, 1992), manipulado no Laboratório de Anatomia Patológica do HUAP.

2. MÉTODO DE IMUNOFLUOROMETRIA A TEMPO RESOLVIDO

A fluorometria de resolução de tempo (TRF) foi a chave para otimizar a sensibilidade da análise.

Fluorometria de resolução de tempo é uma alternativa excelente para o uso de radionuclídeos em análises de laboratório. A tecnologia proporciona análises simples e, acima de tudo, melhor sensibilidade que qualquer outro método não-radioisotópico.

As dosagens de enolase neurônio-específica no líquido pleural (NSE-L), por TRF foram realizadas através do Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural da Disciplina de Pneumologia, vinculada ao Departamento de Medicina Clínica da UFF.

Para afastar suspeita diagnóstica de neoplasia maligna, o valor de referência no soro com intervalo de confiança de 95% preconizado pelo fabricante do kit foi menor do que 12,5 µg/L.

A reprodutibilidade de cada dosagem foi testada por ensaios em duplicata intrateste, com o valor quantitativo final liberado após média aritmética entre as dosagens.

3. ROTEIRO DOS PROCEDIMENTOS e EXAMES

- a) CONDUTA INICIAL: Procedimento de primeira toracocentese com exames do pleurograma no líquido pleural.
- b) CONDUTA POSTERIOR: 1) segunda toracocentese e primeira biópsia pleural fechada com agulha de Cope, com exames do pleurograma no líquido pleural e histopatológico pleural, nos pacientes com quadro clínico e de imagem sugestivos de tuberculose pleural e derrame pleural maligno. Somente foi realizada segunda toracocentese nos derrames pleurais inconclusivos sugestivos de outras causas. 2) procedimentos de toracoscopia e/ou toracotomia foi feitos em pacientes nos quais uma

terceira toracocentese e/ou uma segunda biópsia pleural com agulha de Cope não esclareceram o diagnóstico.

Os procedimentos de toracocentese e biópsia pleural com agulha de Cope foram realizados no Centro Cirúrgico do Ambulatório de Cirurgia do HUAP, pelo autor, com auxílio de alunos dos Cursos de Pós-Graduação em Pneumologia da UFF.

Cabe aduzir que não fazia parte da rotina do ambulatório a solicitação de radiografias convencionais de tórax após o procedimento de toracocentese. Radiografias convencionais de tórax, com incidências em pósterio-anterior, em inspiração e expiração sustentada e perfil, somente eram indicadas com suspeita de complicações após o procedimento de biópsia pleural com agulha de Cope. Não ocorreram complicações com repercussões clínicas após os procedimentos de toracocentese e biópsia pleural fechada com agulha de Cope durante a realização desta pesquisa.

Os procedimentos de toracoscopia e toracotomia, quando necessários, foram realizados pela Equipe de Cirurgia Torácica do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os pacientes que foram excluídos do estudo apresentaram um dos seguintes critérios: contra-indicação absoluta para realização de toracocentese e/ou biópsia pleural com agulha; infecção por HIV; fibrotórax; recusa em realizar toracocentese e/ou biópsia pleural com agulha de Cope e aqueles em que o diagnóstico ficou indeterminado, apesar de exaustivamente investigados.

5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO (MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO DAS CAUSAS DA SÍNDROME DO DERRAME PLEURAL)

O conjunto de critérios usados para o diagnóstico definitivo de tuberculose pleural foi o quadro clínico com acompanhamento ambulatorial por seis meses, associado aos exames que contribuem para o diagnóstico de tuberculose pleural.

Os exames considerados diagnósticos para tuberculose pleural foram: baciloscopia no líquido pleural, cultura de micobactérias, dosagem de ADA no líquido pleural (ADA-L), histopatológico pleural ou citopatologia do líquido pleural sugestiva (linfocitose acima de 90%, células mesoteliais e histiocitárias escassas, hemorragia discreta e componentes do granuloma).

O presente trabalho não considerou o teste tuberculínico importante para o diagnóstico de tuberculose pleural.

O diagnóstico de transudato e exsudato pleural foi realizado com base nos critérios preconizados por LIGHT e Mc GREGOR (1972) e no quadro clínico do paciente.

O diagnóstico de empiema pleural foi confirmado pelo quadro clínico e de imagem do paciente em associação com marcadores de empiema do pleurograma, isto é, glicose, DLH, Gram, cultura e leucograma (LIGHT, 1995).

O diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico foi confirmado pelo quadro clínico do paciente e pela análise de marcadores no sangue e no líquido pleural, tais como hemograma completo, célula LE, VDRL, anticorpo anti-SM, anticorpo anti-DNA, anticorpo anticardiolipina e anticorpo antinuclear (LIGHT, 1995).

O diagnóstico de tromboembolismo pulmonar com derrame pleural foi confirmado pela suspeita do quadro clínico do paciente, principalmente dispnéia intensa em relação ao volume do derrame, aliado a outros exames necessários para o esclarecimento do diagnóstico: mapeamentos cintilográficos V/Q com resultado de probabilidade alta;

cintilografia pulmonar perfusional compatível e radiograma de tórax normal nas áreas afetadas pelos defeitos perfusionais; mapeamento com anormalidades não diagnósticas, associado à identificação objetiva de trombose venosa profunda (TVP); angiotomografia helicoidal de tórax positiva; e arteriografia pulmonar positiva. São critérios de exclusão de TEP: mapeamento perfusional normal ou quase normal; arteriografia pulmonar normal (apesar de haver 3% de falso-negativos e discrepância interobservadores para êmbolos subsegmentares); mapeamento V/Q não diagnóstico associado a estudos negativos de TVP e níveis normais de dímeros-D associados a probabilidade clínica baixa (MENNA-BARRETO, 2005).

Para o diagnóstico de adenocarcinomas ou outros tipos de neoplasias malignas, o exame de citopatologia para células neoplásicas, histopatológico pleural, ganglionar ou pulmonar foram suficientes, com auxílio de marcadores tumorais pleurais, tais como CEA, CYFRA 21-1, entre outros (LIGHT, 1995).

6. MÉTODOS EPIDEMIOLÓGICOS:

a) HIPÓTESES NULA E ALTERNATIVA (EXPERIMENTAL)

Com finalidade de saber se as amostras testadas pertenciam à mesma população, ou seja, se as amostras eram homogêneas, foram comparadas as variâncias e as médias aritméticas das amostras. Duas amostras pertenceriam à mesma população se: a) as suas médias não diferiam significativamente;

b) as suas variâncias não diferiam significativamente.

Para saber se os valores de x_1 são, em média, iguais aos valores de x_2 foi aplicado o teste t bicaudal. Estabeleceu-se as hipóteses: H. Nula: A média dos desvios é igual a zero. H. Alternativa: A média dos desvios é diferente de zero (teste bicaudal).

b) TIPOS DE VARIÁVEIS

As variáveis estudadas na casuística selecionada foram: sexo, idade, dosagem quantitativa de NSE em líquido pleural (NSE-L) de pacientes com diagnóstico confirmado da causa da síndrome do derrame pleural.

O sexo dos pacientes foi considerado como variável independente, categórica, nominal, dicotômica (1 = masculino; 0 = feminino). As idades dos pacientes foram consideradas como variável independente, quantitativa, discreta, em anos. As dosagens de NSE-L foram consideradas como variável independente, quantitativa, contínua, em $\mu\text{g/L}$.

c) DELINEAMENTO

A presente pesquisa classifica-se como um estudo primário, observacional, do tipo transversal, com a finalidade de diagnóstico (MENEZES, 2001; VITIELLO, 1999). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (UFF) com o número 80/02, após receber, analisar e emitir parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa e seu respectivo termo de consentimento livre e esclarecido.

d) CÁLCULO DO TAMANHO MÍNIMO DA AMOSTRA (MOTTA E WAGNER, 2003)

A estimativa do tamanho amostral foi realizada com cálculos para estudos analíticos e a sua execução foi uma preocupação no início do estudo.

O nível máximo de erro tipo I (α) bicaudal foi fixado em 0,05. O nível máximo de erro tipo II (β) unicaudal foi fixado com poder ($1 - \beta$) de 0,80.

Como a variável em estudo foi quantitativa (valores numéricos de NSE-L), pela pesquisa na literatura foram estimadas as médias esperadas do exame no grupo de pacientes com derrame pleural maligno e no grupo controle, com seus respectivos desvios padrões. Pela diferença das médias pode-se saber qual o efeito mínimo a ser detectado pelo estudo.

A pesquisa de ROMERO e colaboradores (1989) detectou uma média para valores quantitativos de NSE-L, pelo método de ELISA, de $25,0 \pm 27,4$ em derrames pleurais malignos e de $8,7 \pm 7,1$ em derrames pleurais benignos.

Após considerações dos valores de alfa e beta estipulados para cálculo do tamanho mínimo das amostras, também foram considerados os desvios padrões e as médias aritméticas dos grupos, a presença de correção de continuidade devido a prevalência pequena dos casos que se quer pesquisar no local de estudo e uma *allocation ratio* igual a 2 (dois).

Segundo o *software* SISA, o cálculo do tamanho mínimo das amostras para se identificar uma eventual diferença, estatisticamente, significativa entre as médias dos dois grupos foi de 15 (quinze) amostras para um grupo estudado (casos) e 30 (trinta) amostras para outro grupo estudado (controles). Total mínimo de 45 (quarenta e cinco) amostras em ambos os grupos.

e) COLETA DE DADOS (CASUÍSTICA)

Descrita no capítulo IV.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS PARA DETERMINAR A PROBABILIDADE DE QUE A HIPÓTESE NULA SEJA VERDADEIRA

Após a coleta, os dados dos 70 (setenta) líquidos pleurais de pacientes com diagnóstico comprovado de síndrome do derrame pleural foram transferidos dos prontuários para a planilha eletrônica do *Microsoft Excel™*, versão 2003. No momento da análise estatística, os dados selecionados para cálculo foram transferidos para planilha do programa MedCalc, com objetivo de estudo descritivo e inferencial.

O planejamento estatístico inferencial inicial foi realizado através dos testes mencionados nos parágrafos seguintes, após estudo para testar a distribuição de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) dos dados das variáveis incluídas na pesquisa.

a) Tipos de análise estatística dos dados (SPIEGEL, 1994)

Na dependência das variáveis estudadas e do teste de distribuição de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os seguintes tipos de análise estatística dos dados foram empregados: análise comparativa de variância não paramétrica das diversas causas de síndrome do derrame pleural, tabelas de contingência 2 x 2 e testes de análise multivariada.

A análise multivariada é uma ferramenta estatística que processa as informações de modo a simplificar a estrutura dos dados e a sintetizar as informações quando o número de variáveis envolvidas é muito grande, facilitando o entendimento do relacionamento existente entre as variáveis do processo. De modo geral, refere-se a todos os métodos estatísticos que, simultaneamente, analisam múltiplas medidas sobre cada indivíduo ou objeto sob investigação (HAIR et al., 1998)

A finalidade de uma análise multivariada é medir, explicar e prever o grau de relacionamento entre variáveis estatísticas (HAIR et al., 1998).

Neste trabalho a análise multivariada foi realizada por técnicas de: a) regressão logística múltipla com o objetivo de regressão (predição) do diagnóstico de líquido pleural maligno pelas variáveis independentes sexo, idade e NSE-L; b) ANOVA não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis com o objetivo de comparação de médias entre os diversos grupos de causas de líquidos pleurais encontrados na pesquisa atual. Testes *post-hoc* de Dunn e de comparações entre pares de médias usando-se o teste da soma de postos de Wilcoxon-Mann-Whitney com um ajuste descendente do nível alfa para compensar as comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

b) Medidas de associação e medidas de significância (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

Foram realizados testes não-paramétricos de qui-quadrado e coeficiente de correlação descritos nos resultados.

Um coeficiente de correlação é uma medida padronizada do grau de associação (variação concomitante) entre duas variáveis. Neste trabalho foi calculado o **coeficiente de Spearman**, entre a variável dependente e cada variável independente, como procedimento inicial (análise univariada) antes dos cálculos de análise multivariada por regressão logística múltipla.

O teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney foi feito para diferenças entre as médias (idade, NSE-L) dos casos e controles e entre os grupos estudados.

Para testar a significância da hipótese de nulidade na tabela de contingência para o valor diagnóstico de NSE-L com o valor de referência selecionado, isto é, $H_0: p_1 = p_2$, o teste do qui-quadrado de Pearson foi utilizado. O teste não-paramétrico de significância **qui-quadrado de Pearson** (idealizado por Karl Pearson em 1890), foi utilizado com a correção de Yates, devido ao tamanho da amostra dos casos ser menor do que 40 (SPIEGEL, 1994).

Os testes de significâncias foram aplicados para testar a hipótese de que os erros com falsos positivos e falsos negativos ocorreram por mera casualidade, isto é, os valores observados não diferiram dos valores esperados por chance de amostragem.

O valor de qui-quadrado foi obtido mediante fórmula estatística que relaciona somente as freqüências observadas em uma **tabela quádrupla** (SPIEGEL, 1994).

Os valores de p bicaudal de todos os testes aplicados foram estabelecidos em 5% para a probabilidade alfa, isto é, a hipótese de nulidade foi rejeitada com $p \leq 0,05$.

c) Medidas de validação do teste da NSE-L

Cálculo das **freqüências** das diversas causas de síndrome do derrame pleural que constituiu a casuística estudada (MENEZES, 2001).

Para caracterizar, quantitativamente, a validade do teste da NSE-L foram utilizados os seguintes parâmetros: **sensibilidade**, **especificidade** e **eficiência** das dosagens (ARMITAGE e BERRY, 1994).

Sensibilidade é a proporção de positivos verdadeiros, ou seja, mede a capacidade de reação do teste em um paciente doente.

Especificidade é a proporção de negativos verdadeiros, ou seja, a medida da capacidade do método de decisão de apontar ausência da condição para aqueles casos que realmente não a têm (não reação do teste em pacientes não portadores da doença).

Geralmente, para qualquer tarefa de decisão médica, a sensibilidade e a especificidade variam em direções opostas, ou seja, quando o teste é muito sensível a positivos, isto tende a gerar muitos falsos-positivos. Conseqüentemente, a especificidade diminui porque o número de falsos-negativos cai. O oposto acontece quando o teste tem uma baixa sensibilidade: a especificidade cai devido ao grande número de falsos-negativos, às expensas de uma alta sensibilidade. Em conseqüência, um método de decisão perfeito (100 % de sensibilidade e especificidade) raramente é alcançado, e um balanço entre ambas medidas de desempenho deve ser atingido.

Eficiência ou acurácia é a proporção de predições corretas (soma de positivos verdadeiros e negativos verdadeiros) no total da amostra examinada. Significa a *performance* de um teste diagnóstico.

Para determinar o ponto de corte da NSE-L nas amostras de líquido pleural maligno, foi calculado um **limiar de reatividade** (*cut off* ou **limiar crítico discriminativo ou ponto de corte**) com eficiência máxima mais adequado para o diagnóstico de derrame pleural maligno com o teste da NSE-L por quatro procedimentos estatísticos diferentes e recomendados pela literatura especializada (FLETCHER et al., 1996; HULLEY et al., 2001; GLAS et al., 2003): a) método do contrabalanço de sensibilidade e especificidade; b) apresentação gráfica conhecida como **curva ROC** (*relative ou receiver operating characteristic curve*); c) cálculo da razão de verossimilhança para teste positivo; d) cálculo de odds ratio diagnóstico.

Para avaliar a probabilidade de ocorrência ou não de derrame pleural maligno, em relação a NSE-L, foram calculados os **valores preditivos** (ou diagnósticos) do teste sem o **Teorema de Bayes** (MENEZES, 2001).

Preditividade positiva é a proporção de positivos verdadeiros em relação a todas as predições positivas. Preditividade negativa é a proporção de negativos verdadeiros em relação a todas as predições verdadeiras.

Após selecionar o valor de referência mais adequado para o exame da NSE-L e como uma forma alternativa para descrever o seu desempenho, para o diagnóstico de derrame pleural maligno, foram calculados os seguintes indicadores globais de concordância (parâmetros discriminativos): **índice da probabilidade do teste positivo** ou **razão de verossimilhança positiva** (*likelihood ratio* para teste positivo ou LR+), **índice da probabilidade do teste negativo** ou **razão de verossimilhança negativa** (*likelihood ratio* para teste negativo ou LR-), **indicador kappa (κ)**, para o ponto de corte selecionado e **odds ratio diagnóstico** (ARMITAGE e BERRY, 1994).

Limites de confiança a 95% foram estabelecidos para os índices de validade e parâmetros discriminativos do diagnóstico da NSE-L.

d) Programas computadorizados empregados

Planilha do *Software Microsoft Excel*, versão 2003, para catalogação dos dados dos prontuários dos pacientes. Programa denominado MedCalc para cálculo da área sob a curva ROC (AUC), *odds ratio* diagnóstico e demais procedimentos da estatística descritiva e inferencial.

Programa denominado GraphPad Prism 3.0, para cálculo dos testes *post-hoc*.

Programa denominado SISA (*Simple Interactive Statistical Analysis*) para cálculo do tamanho mínimo das amostras.

Software analyse-it para gráfico da curva ROC.

Os cálculos do valor diagnóstico e discriminativo do teste de NSE-L, foram confirmados através de um *software* (especializado para operar em windows) desenvolvido por BRAILE e GODOY, em 1999.

IV – CASUÍSTICA

A) POPULAÇÃO - ALVO

Pacientes que procuraram, espontaneamente ou referenciados, o Ambulatório de Pesquisa em Pleurologia, situado no Hospital Universitário Antonio Pedro, vinculado ao Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Pneumologia e ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas, do Centro de Ciências Médicas da UFF, município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, no período entre janeiro de 2003 a janeiro de 2006.

Todos os pacientes compareceram ao Ambulatório após diagnóstico clínico e por imagem de síndrome de derrame pleural. Todos os pacientes foram encaminhados ao ambulatório para realização de procedimentos e exames que diagnosticassem a causa da síndrome existente. Todos os líquidos pleurais, provenientes do ambulatório, foram encaminhados para o Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural, vinculado à Disciplina de Pneumologia do Departamento de Medicina Clínica da UFF, para processamento inicial das amostras.

Na casuística estudada, grande parte dos pacientes foram examinados por no mínimo seis meses e máximo de cinco anos no ambulatório. Exceção para aqueles que após diagnóstico evoluíram para óbito.

B) TAMANHO DAS AMOSTRAS

Obedecendo aos critérios de exclusão, inclusão e aos cálculos estatísticos para tamanho mínimo das amostras, foram selecionados para esta pesquisa 70 (setenta) amostras de líquido pleural de pacientes com derrame pleural com vários diagnósticos.

Como se tratou de uma pesquisa clínica-laboratorial diagnóstica, a técnica utilizada e adequada consistiu na comparação estatística de dois grupos de pacientes: grupo I (com diagnóstico de síndrome de derrame pleural tendo como causa comprovada derrames pleurais malignos) e Grupo II (com diagnóstico de síndrome do derrame pleural por outras causas comprovadas – grupo controle).

Resumo na tabela 4.

No grupo I, o teste padrão áureo utilizado para confirmação do diagnóstico com o teste da NSE-L foi o citopatológico pleural. Quando esse exame era inconclusivo, foi confirmado o diagnóstico de câncer pleural através de outros exames, tais como histopatológico pleural, obtido por diversos procedimentos (biópsia pleural fechada com agulha tipo Cope ou toracoscopia ou toracotomia).

Cabe ressaltar que foi tomada por parte do autor precauções quanto à precisão para a validade do uso da NSE-L como teste diagnóstico e marcador de diferenciação neuroendócrina no líquido pleural. As principais evidências foram:

a) o grupo controle foi integrado por pacientes com doença semelhante (diagnóstico diferencial) à doença em estudo e não por pessoas clinicamente normais ou não doentes (controles errôneos);

b) o padrão áureo utilizado foi um conjunto de critérios usados para o diagnóstico definitivo da doença mencionada como causa da síndrome do derrame pleural, conforme descrito na parte de métodos;

c) houve comparação independente e cega com um padrão áureo de diagnóstico. Esta frase significa que os resultados dos exames considerados padrão áureo não eram conhecidos pelo profissional de saúde que realizava a dosagem da NSE-L que foi apresentada para validação;

d) o exame diagnóstico da NSE-L foi avaliado em um espectro adequado de pacientes, isto é, no local e nos pacientes a quem seria aplicado tal exame em caso de uma eventual significância estatística e clínica.

Todas as precauções de precisão relatadas nos parágrafos anteriores foram realizadas a partir das mencionadas na literatura nacional e internacional. Destaco o livro de SACKETT et al., 2001.

Tabela 4 – Casuística do Estudo Transversal para Expressão de Fenótipo Neuroendócrino e Parâmetros Diagnósticos da Enzima Enolase Neurônio-Específica no Líquido Pleural

CASUÍSTICA	CAUSA DO LÍQUIDO PLEURAL	NÚMERO DE LÍQUIDOS PLEURIS
Grupo I	Derrames pleurais malignos *	20
Grupo II (controle)	Derrame pleurais benignos	50
TOTAL		70

FONTE: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Disciplina de Pneumologia/UFF. Período: 2003-2006. * Padrão áureo: exames de citopatologia e/ou histopatologia pleural por diversos procedimentos.

V - RESULTADOS

Na tabela 5 estão identificados, com as variáveis sexo, idade e dosagem de NSE-L, os 20 (vinte) líquidos pleurais dos pacientes com derrame pleural maligno para expressão de fenótipo neuroendócrino na síndrome do derrame pleural.

Tabela 5 – Casuística dos Pacientes (n = 20) com Derrame Pleural Maligno para Expressão de Fenótipo Neuroendócrino na Síndrome do Derrame Pleural. Dosagem de Enolase Neurônio-Específica por Imunofluorometria a Tempo Resolvido

ORDEM	IDENTIFICAÇÃO	IDADE (anos)	SEXO (M/F)	NSE-L (µg/L)	CAUSA
01	ESG	89	M	1, 4	Adenocarcinoma de pulmão
02	SEM	68	F	126, 5	NSCLC
03	MACFS	82	F	130, 7	Adenocarcinoma de pulmão
04	ESAV	49	F	0, 2	Linfoma
05	DPS	76	M	0, 1	Linfoma
06	BAB	92	F	8, 7	Adenocarcinoma de pulmão
07	AMV	83	F	3, 5	Adenocarcinoma de pulmão
08	SFS	42	M	6, 9	Adenocarcinoma de pulmão
09	MMSC	71	F	46, 6	Adenocarcinoma de pulmão
10	ET	45	M	147, 9	Adenocarcinoma de pulmão
11	RMNR	35	M	161, 9	Linfoma
12	CPB	78	F	27, 7	Adenocarcinoma de pulmão
13	APM	77	M	1, 1	NSCLC
14	JMJ	55	F	3, 1	Neuroblastoma
15	GLL	74	M	15, 3	NSCLC
16	LRC	78	M	20, 4	Adenocarcinoma de pulmão
17	LMB	42	F	2, 3	Adenocarcinoma de pulmão
18	IBS	67	F	25,8	Adenocarcinoma de pulmão
19	MVC	79	M	1,7	Linfoma
20	CSSM	70	F	38,5	Adenocarcinoma

FONTE: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/UFF (2003-06)

NSE-L: Enolase Neurônio Específica no Líquido Pleural

M: Sexo Masculino/F: Sexo Feminino. NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer

Na casuística dos derrames pleurais malignos (tabela 5) não existiu tipo histológico do SCLC. A maior frequência dos tipos histológicos metastáticos predominantes com líquido pleural maligno foi o adenocarcinoma (12/20 ou 60,0%), seguido dos linfomas (4/20 ou 20,0 %), NSCLC (3/20 ou 15,0 %) e um caso de neuroblastoma (5,0 %).

Na tabela 6 estão identificados, com as variáveis sexo, idade e dosagem de NSE-L, os 50 (cinquenta) líquidos pleurais dos pacientes com derrame pleural por causas diversas (grupo controle) para avaliação de expressão de fenótipo neuroendócrino na síndrome do derrame pleural.

Tabela 6 – Casuística dos Pacientes (n = 50) com Derrame Pleural Não – Maligno (Grupo Controle) para Expressão de Fenótipo Neuroendócrino na Síndrome do Derrame Pleural. Dosagem de Enolase Neurônio-Específica por Imunofluorometria a Tempo Resolvido

ORDEM	IDENTIFICAÇÃO	IDADE (anos)	SEXO (M/F)	NSE-L (µg/L)	CAUSA
01	TPG	79	F	0, 1	Tuberculose
02	ACFF	37	F	3, 6	Tuberculose
03	JRS	52	M	2, 2	Tuberculose
04	DM	46	F	28, 5	Empiema
05	VSG	70	M	1, 2	Tuberculose
06	MFLF	87	F	8, 1	Empiema
07	FSCA	29	F	20, 4	Empiema
08	CCS	94	M	0, 4	TEP
09	EAL	67	F	6, 1	TEP
10	JSB	81	M	0, 7	Transudato
11	ZN	84	F	1, 5	Uremia
12	BPCA	37	M	2, 1	Tuberculose
13	NSA	66	F	0, 8	Uremia
14	RCV	36	M	0, 4	Tuberculose
15	RMFN	8	M	5, 6	Tuberculose
16	LMF	23	M	7, 9	Tuberculose
17	AAC	82	M	0, 7	Transudato
18	AJS	59	M	5, 0	TEP
19	FLRS	23	M	4, 7	Empiema
20	PCP	50	M	0, 1	Transudato
21	UMF	41	M	166, 1	Tuberculose/Uremia
22	ARM	94	F	0, 3	Tuberculose
23	RG	50	M	3, 3	Tuberculose
24	MFBF	25	M	4, 0	Tuberculose
25	GSF	23	M	2, 3	Tuberculose

26	VLO	50	M	14,3	Tuberculose
27	MFO	23	F	9,1	Tuberculose
28	CDE	70	M	0,1	Transudato
29	FRS	41	M	22,8	Tuberculose
30	NPOM	81	F	4,9	TEP
31	ENM	78	M	4,0	TEP
32	DFN	11	M	3,2	Paracoccidiodomicose
33	FOS	23	F	1,9	Tuberculose
34	AVS	29	M	3,3	Parapneumônico
35	ACB	42	M	10,0	Tuberculose
36	ASE	27	F	13,0	Tuberculose
37	AISG	46	F	2,6	Tuberculose
38	ARM	48	F	3,3	Tuberculose
39	BSB	5	F	15,8	Parapneumônico
40	RLN	31	M	21,9	Tuberculose
41	DSR	21	F	0,5	Tuberculose
42	ERS	37	F	9,1	Empiema
43	WSP	03	M	3,9	Empiema
44	VG	80	M	0,2	Empiema
45	JCA	75	M	1,7	Parapneumônico
46	JC	87	M	0,5	Transudato
47	DNF	30	F	16,2	Parapneumônico
48	JP	50	F	0,7	Transudato
49	ALC	84	M	1,0	Hemotórax
50	WSR	54	M	27,4	Parapneumônico

FONTE: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Disciplina de Pneumologia – Universidade Federal Fluminense. Janeiro 2003-Janeiro 2006

NSE-L: Enolase Neurônio Específica no Líquido Pleural

TEP: Tromboembolismo Pulmonar

M: Sexo Masculino/**F:** Sexo Feminino

A tabela 7 resume os resultados da estatística descritiva encontrados para as variáveis estudadas nos 70 (setenta) pacientes com síndrome do derrame pleural.

Tabela 7 - Estatística descritiva das variáveis obtidas nos casos (líquido pleural maligno) e controles (líquido pleural benigno de causas diversas) dos pacientes com síndrome do derrame pleural da pesquisa

VARIÁVEIS	CASOS (N = 20)	CONTROLES (N = 50)
Média de idade (anos)	67,6	49,3
Limite de idade (anos)	35 – 92	3 – 94
Desvio padrão da idade	16,93	25,63
Coeficiente de variação da idade (%)	25,2	52,2
Média de atividade de NSE-L (µg/L)	38,51	9,35
Limite de NSE-L (µg/L)	0,1 – 161,9	0,1 – 166,1

Desvio padrão de NSE-L ($\mu\text{g/L}$)	54,96	23,79
Coeficiente de variação de NSE-L (%)	142,7	254,4
Sexo feminino (%)	55,0	40,0
Sexo masculino (%)	45,0	60,0

FONTE: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Disciplina de Pneumologia – Universidade Federal Fluminense. Janeiro 2003-Janeiro 2006

A tabela 8 resume a análise para distribuição de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov dos valores encontrados de NSE-L nos casos e controles nos 70 líquidos pleurais analisados.

Tabela 8 – Análise para distribuição de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov dos valores encontrados de NSE-L nos derrames pleurais malignos (casos) e controles (causas diversas) nos 70 líquidos pleurais analisados

GRUPOS	VALOR DE P	INTERPRETAÇÃO *
Câncer	0,074	Aceita
Controles	< 0,001	Rejeitada
Empiema pleural	0,580	Aceita
Tuberculose	0,004	Rejeitada
Parapneumônico	0,947	Aceita
Tromboembolismopulmonar	0,734	Aceita
Transudato	0,631	Aceita
Uremia	-	Amostra pequena
Paracoccidioidomicose	-	Amostra pequena

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2007);* Aceita-se normalidade ou H_0 quando $p > 0,05$

I - TESTES DE SIGNIFICÂNCIA COM NSE-L

Considerando as amostras independentes e o resultado da análise de distribuição de normalidade resumido na tabela 8, a tabela 9 resume a estatística inferencial comparando as médias aritméticas de dosagem da dosagem de NSE-L dos casos e controles pelo teste não-paramétrico U de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Tabela 9 – Comparação entre as Médias Aritméticas de Dosagem da Enolase Neurônio Específica (NSE-L) dos casos e controles pelo Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney

NSE-L ($\mu\text{g/L}$)	Valor de Z	Resultado de p bicaudal *
Casos vs Controles	2,1645	P = 0,0304

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006); * Ha: $p < 0,05$

A tabela 10 resume a estatística descritiva de dosagem da NSE-L das causas diversas de síndrome do derrame pleural analisados. Na tabela 10, também foi realizada a estatística inferencial para comparação entre as múltiplas causas de síndrome do derrame pleural da pesquisa. Considerando as amostras independentes, o tamanho das amostras desiguais, o resultado da análise de distribuição de normalidade e análise de variância desiguais, o método estatístico indicado foi o não-paramétrico ANOVA de Kruskal-Wallis por classificações. Este teste serve para se compararem duas ou mais populações quanto à tendência central dos dados.

Tabela 10 – Estatística Descritiva e Inferencial da Dosagem de Enolase Neurônio Específica (NSE-L) em 70 Líquidos Pleurais para Comparações Múltiplas entre as Diversas Causas de Síndrome do Derrame Pleural

CAUSA	NÚMERO DE AMOSTRAS	LIMITES DE DOSAGENS NSE-L ($\mu\text{g/L}$)	MÉDIA ARITMÉTICA NSE-L ($\mu\text{g/L}$) *	VARIÂNCIA
Neoplasia Maligna	20	0,1 – 161,9	38,51	3020,85
Tuberculose	23	0,1 – 166,1	12,97	1156,46
Empiema pleural	07	0,2 – 28,5	10,7	102,12
Transudato	06	0,1 – 0,7	0,46	0,086
Parapneumônico	05	1,7 – 27,4	12,8	111,78
Tromboembolismo Pulmonar	05	0,4 – 6,1	4,08	4,78
Uremia	02	0,8 – 1,5	1,15	0,24
Paracoccidioidomicose	01	3,2	-	-
Hemotórax	01	1,0	-	-

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006); * Teste de Kruskal-Wallis: $H = 16,33$ ($p=0,0121$)

Como acontece no teste F de uma ANOVA paramétrica, o valor significativo de 16,33 de H ($p=0,0121$) não indica entre que grupos, especificamente, ocorrem as diferenças. Para identificar diferenças significativas entre as médias aritméticas dos grupos tomados dois a dois, uma possibilidade é usar um procedimento não-paramétrico de comparações múltiplas. Neste caso, as comparações *post hoc* (do latim, significando “depois disso”) entre pares de médias podem ser feitas usando-se o teste da soma de postos de Wilcoxon-Mann-Whitney com um ajuste descendente do nível alfa para compensar as comparações múltiplas (tabela 11). Isto porque quando são realizadas várias comparações planejadas, a probabilidade de se obter a significância estatística ao acaso está aumentada ou a probabilidade de um erro tipo I aumenta.

Tabela 11 – Comparações *Post-Hoc* entre as Médias de Dosagens de Enolase Neurônio-Específica nas Diversas Causas de Líquidos Pleurais Analisados com o Grupo do Derrame Pleural Maligno pelo Teste da Soma dos Postos de Wilcoxon

GRUPOS	VALOR DE Z	RESULTADO *
Câncer vs Tuberculose	1,534	P = 0,125
Câncer vs Transudato	-3,103	P = 0,0019
Câncer vs Tromboembolismo Pulmonar	- 1,086	P = 0,277
Câncer vs Empiema Pleural	- 0,442	P = 0,658
Câncer vs Parapneumônico	- 0,237	P = 0,812

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006); * H_1 : alfa corrigido para cinco observações (0,05/5) igual a $p < 0,01$

A tabela 12 resume as comparações múltiplas entre as medianas de dosagens de NSE-L nos 70 líquidos pleurais, tendo como causas principais derrames pleurais malignos e suas causas e os derrames pleurais benignos.

Tabela 12 – Comparações Múltiplas entre as Medianas de Dosagens de Enolase Neurônio Específica (NSE-L) em 70 Líquidos Pleurais

CAUSA	NÚMERO DE AMOSTRAS	LIMITES DE DOSAGENS (NSE-L - $\mu\text{g/L}$)	MÉDIA ARITMÉTICA (NSE-L - $\mu\text{g/L}$)	MEDIANA (NSE - $\mu\text{g/L}$) *
Neoplasias Malignas	20	0,1 – 161,9	38,51	12,0
Linfomas	04	0,1 – 161,9	40,97	0,95
NSCLC	15	1,4 - 130,7	38,5	12,0
Neuroblastoma	01	3,1	-	-
Doenças benignas	50	0,1 – 161,9	9,3	3,3

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

* Teste de Kruskal-Wallis: $H = 9,998$ ($p=0,0067$); Teste Post-Hoc de Dunn: doenças Benignas vs NSCLC: $p < 0,01$), linfomas vs NSCLC ($p > 0,05$) e doenças benignas vs linfomas ($p > 0,05$)

Os testes de significância, e sua probabilidade alfa de 5 %, aplicados nas comparações das tabelas 9, 10, 11 e 12, asseguraram apenas que os resultados (dados) encontrados não ocorreram ao acaso da amostragem. Não disseram absolutamente nada do valor clínico do teste da NSE-L, nem foi garantia de que vieses importantes não tenham ocorrido no estudo. Logo, mais importante do que efetuar um teste de significância foi estabelecer índices de validação de uma dosagem de NSE-L para uso clínico e seus respectivos limites de confiança a 95 %.

II - MEDIDAS DE VALIDAÇÃO DO TESTE DA NSE-L

A tabela 13 resume as freqüências das diversas causas de líquidos pleurais incluídos no estudo transversal.

Tabela 13 – Frequência das Causas dos 70 Líquidos Pleurais Analisados para Dosagem de NSE-L pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido em um Delineamento Transversal

CAUSA	NÚMERO DE LÍQUIDOS PLEURAIIS (n)	FREQUÊNCIA (%)	INTERVALO DE CONFIANÇA A 95%
Tuberculose	23	33,0	22,9 – 44,5
Neoplasia Maligna	20	29,0	19,3 – 40,09
Empiema pleural	07	10,0	4,90 – 19,20
Transudato	06	9,0	4,05 – 17,4
Parapneumônico	05	7,0	3,16 – 15,6
Tromboembolismo Pulmonar	05	7,0	3,16 – 15,6
Uremia	02	3,0	0,88 – 9,8
Paracoccidiodomicose	01	1,0	0,34 – 7,59
Hemotórax	01	1,0	0,34 – 7,59
TOTAL (N)	70	100,0	0,34 – 44,5

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

Um teste diagnóstico para ser utilizado na prática clínica precisa de parâmetros de validade. Estes parâmetros, porém, somente podem ser calculados a partir de um valor de referência selecionado. Portanto, a escolha adequada de um valor de referência é condição imprescindível para uso laboratorial e clínico de um teste diagnóstico.

1) Cálculo do Limiar de Reatividade (Pontos de Corte, Valor de Referência ou Cut-off) da NSE-L pelo Método do Contrabalanço

A tabela 14 apresenta o contrabalanço (*trade-off*) entre sensibilidade e especificidade e o resultado das eficiências diversas do teste da NSE-L encontradas para o diagnóstico de derrame pleural maligno, pelo método de imunofluorometria a tempo resolvido. Os diversos valores de limiar crítico discriminativo foram utilizados a partir dos dados das tabelas 5 e 6.

Tabela 14 – Determinação do Limiar de Reatividade do Exame da NSE-L para Líquido Pleural Maligno pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido por Contrabalanço entre Sensibilidade e Especificidade

PONTOS DE CORTE NSE-L (µg/L)	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE (%)	EFICIÊNCIA (%)
≥ 6,9	60,0	70,0	67,1
≥ 14,3	50,0	82,0	72,9
≥ 28,5 *	30,0	96,0	77,1
≥ 126,5	20,0	98,0	75,7

FONTE: Tabelas 5 e 6. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006); * Valor de limiar crítico discriminativo com eficiência máxima

2) Cálculo do Limiar de Reatividade da NSE-L pelo Método da Curva ROC

Quando se tem uma variável contínua e pretendemos transformá-la numa variável dicotômica (doente/não doente), temos que utilizar um determinado valor na escala contínua que discrimine entre essas duas classes ("cut-off point").

A curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) é uma forma de representar a relação entre a sensibilidade e a especificidade de um teste de diagnóstico quantitativo, ao longo de um contínuo de valores de referência.

Constrói-se uma curva ROC traçando um gráfico que represente a sensibilidade em função da proporção de falsos positivos (1- especificidade) para um conjunto de valores de "cut-off point".

A intenção com que se utilizará o teste diagnóstico é o que vai influenciar a escolha do "cut-off point" e, portanto, das características do teste. Assim sendo, a escolha do "ponto de corte" depende do que se pretende do teste em termos de especificidade e sensibilidade.

As curvas ROC descrevem a capacidade discriminativa de um teste diagnóstico para um determinado número de valores de referência. Isto permite colocar em evidência

os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade. O ponto, numa curva ROC, onde isto acontece, é aquele que se encontra mais próximo do canto superior esquerdo do diagrama. Para além disto, as curvas ROC permitem quantificar a exatidão de um teste diagnóstico, uma vez que esta é proporcional à área sob a curva ROC (tanto maior é a sua exactidão, quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do diagrama). Deste modo, uma curva ROC é também útil na comparação de testes diagnósticos.

A figura 1 apresenta a curva ROC do teste da NSE-L para o diagnóstico de derrame pleural maligno, calculado pelo *software* Analyse-it, a partir dos dados das tabelas 5 e 6. O próprio programa estatístico (MedCalc) tem como critério seleccionar o ponto ideal para valor de referência aquele que possui acurácia máxima, isto é, resultados com mínimos falsos negativos e falsos positivos.

A acurácia de um teste diagnóstico pela curva ROC é representada pelo valor da área sob a curva ROC (AUC).

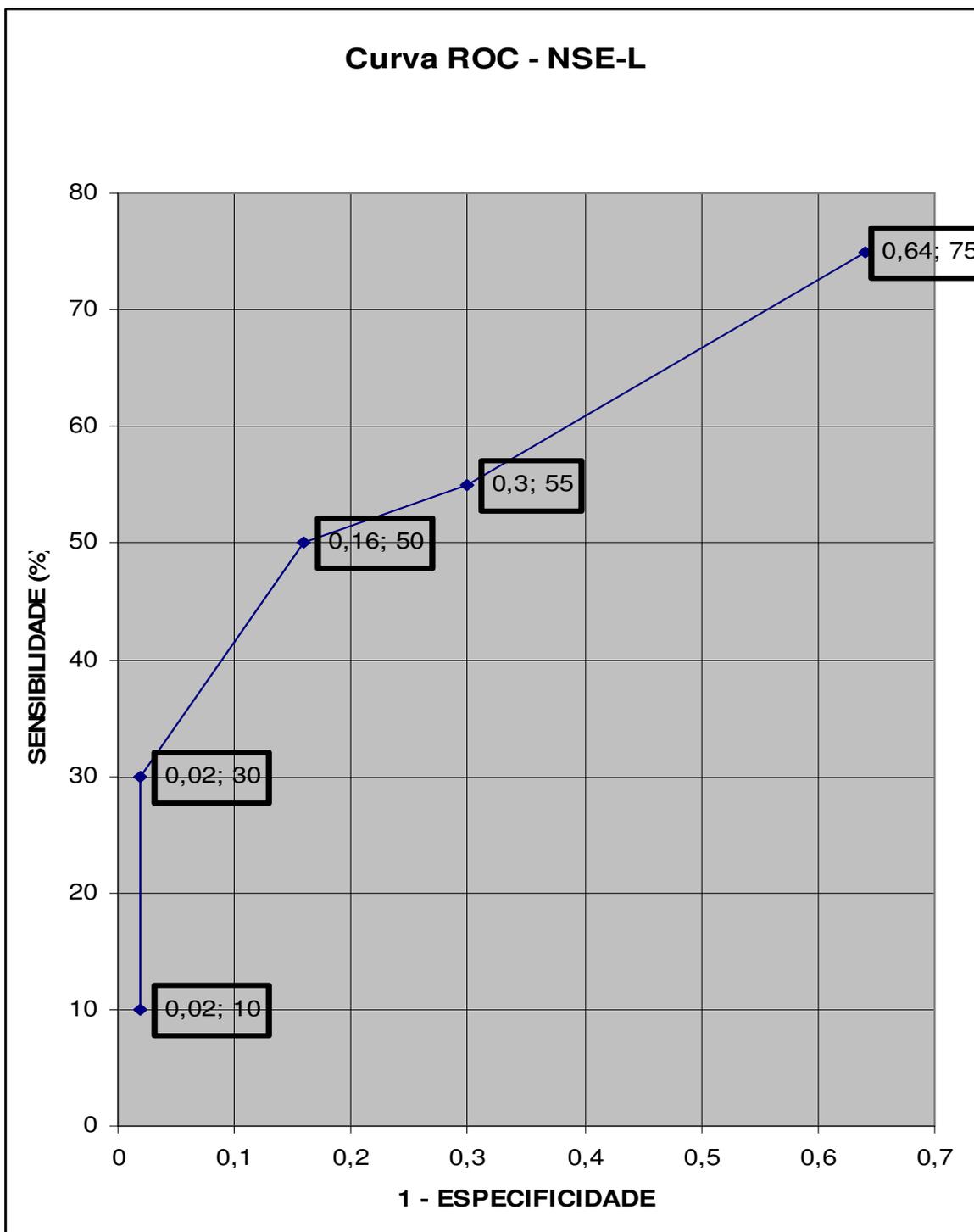


Figura 1 – Curva ROC representando diversos pontos de corte da NSE-L para diagnóstico de derrame pleural maligno. AUC igual a 0,666 (IC 95%: 0,544 – 0,775; $p = 0,0265$). Sensibilidade de 50,0 % (IC 95%: 27,2 – 72,8) e especificidade de 84,0 % (IC 95%: 70,9 – 92,8) para o ponto de corte selecionado pelo *software* MedCalc (maior ou igual a 14,3 $\mu\text{g/L}$).

3) Cálculo do Limiar de Reatividade da NSE-L pelo Método da Razão de Verossimilhança Positiva

Ao contrário do método de contrabalanço e da apresentação gráfica da curva ROC, um outro procedimento estatístico, segundo HULLEY et al (2001), para resumir as informações sobre um teste diagnóstico com resultados contínuos ou ordinais para determinar seu valor de referência são as razões de verossimilhança ou razões de probabilidades diagnósticas (*likelihood ratios* ou *LR*).

Resultados de LR permitem que sejam aproveitadas todas as informações disponíveis em um teste. Para cada resultado do teste, o LR é o quociente entre a probabilidade de encontrar-se o resultado em alguém com a doença e a probabilidade de encontrá-lo em alguém sem a doença.

A tabela 15 apresenta e resume os valores de LR para um teste positivo pelo exame da NSE-L para diagnóstico de líquido pleural maligno para diversos valores de referência arbitrados com base nas tabelas 5 e 6. Os cálculos foram realizados pelo *software* desenvolvido por BRAILE e GODOY.

Tabela 15 – Razões de Verossimilhança para Determinação do Limiar de Reatividade do Exame da NSE-L para Líquido Pleural Maligno pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido

PONTOS DE CORTE (NSE – µG/L)	RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA PARA TESTE POSITIVO
≥ 6,9	2,0
≥ 14,3	2,8
≥ 28,5	7,5
≥ 126,5 *	10,0

FONTE: Tabelas 5 e 6. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006) * Ponto de corte com maior valor de LR+

4) Cálculo do Limiar de Reatividade da NSE-L pelo Método do Odds Ratio Diagnóstico (DOR)

O cálculo do DOR para diagnóstico de derrame pleural maligno pela NSE-L, para os diversos valores de referência selecionados pelos procedimentos estatísticos anteriores está resumido na tabela 16.

Tabela 16 – Cálculo de Odds Ratio Diagnóstico (DOR) para Determinação do Limiar de Reatividade do Exame da NSE-L para Líquido Pleural Maligno pelo Método de Imunofluorometria a Tempo Resolvido

PONTOS DE CORTE SELECIONADOS (NSE – µg/L)	DOR
≥ 6,9	3,3
≥ 14,3	4,6
≥ 28,5 *	10,7
≥ 126,5	9,2

FONTE: Tabelas 13, 14 e Figura 1. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

* Ponto de corte com maior valor de DOR

Após escolha do ponto de corte de 28,5 µg/L como valor de referência do teste da NSE-L para diagnóstico de líquido pleural maligno e expressão do fenótipo neuroendócrino no líquido pleural, foi calculado os parâmetros de validade da NSE-L para uso clínico (tabela 17).

O teste não-paramétrico de qui-quadrado (χ^2) foi calculado para avaliar se existia diferença estatisticamente significativa entre os casos e controles com diagnóstico pela NSE-L com o valor de referência selecionado, ou seja, 28,5 µg/L).

Tabela 17 – Parâmetros de Validade com Limiar de Reatividade Maior ou Igual a 28,5 µg/L do Exame da Enolase Neurônio-Específica para Diagnóstico de Líquido Pleural Maligno e Expressão de Fenótipo Neuroendócrino no Líquido Pleural

ÍNDICES	RESULTADO (%)	INTERVALO DE CONFIANÇA A 95%
Sensibilidade	30,0	9,9 – 50,1
Especificidade	96,0	90,6 – 101,4
Valor Preditivo (+)	75,0	45,0 – 105,0
Valor Preditivo (-)	77,4	67,0 – 87,8
Eficiência	77,1	67,3 – 87,0
Prevalência (probabilidde pré-teste)	28,6	18,0 – 39,2

FONTE: Tabela 15. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006); $\chi^2 = 9,54$ ($p \leq 0,01$)

A tabela 18 resume os indicadores globais de concordância ou parâmetros discriminativos calculados para o teste da NSE-L para diagnóstico de líquido pleural maligno e expressão do fenótipo neuroendócrino no líquido pleural com o valor de referência selecionado.

Tabela 18 – Parâmetros Discriminativos com Limiar de Reatividade Igual ou Maior a 28,5 µg/L do Exame da Enolase Neurônio-Específica para Diagnóstico de Líquido Pleural Maligno e Expressão de Fenótipo Neuroendócrino no Líquido Pleural

PARÂMETROS DISCRIMINATIVOS	RESULTADO	INTERVALO DE CONFIANÇA A 95 %
Razão de Verossimilhança (+)	7,5	-
Razão de Verossimilhança (-)	0,73	-
Indicador Kappa de Cohen *	0,32	0,02 – 0,61
<i>Odds Ratio</i> Diagnóstico	10,27	-

FONTE: Tabela 15. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006); * Indicador de confiabilidade que leva em conta a concordância observada ao acaso. A concordância estimada pelo exame da NSE-L para diagnóstico de líquido pleural maligno foi considerada razoável (0,21 – 0,4), segundo LANDIS e KOCH, 1977.

Um estudo de correlação pelo coeficiente de Spearman (r_s) foi realizado com a finalidade de avaliar a associação das variáveis independentes (sexo, idade e níveis de NSE-L) com o diagnóstico de líquido pleural maligno. Os seguintes resultados foram calculados: idade ($r_s=0,309$; $p=0,0102$), sexo ($r_s=-0,136$; $p=0,2571$; NSE-L ($r_s=0,261$; $p=0,0304$).

A tabela 19 finaliza os resultados da pesquisa apresentando a análise multivariada pela técnica de regressão logística múltipla. Estes cálculos tiveram por finalidade identificar quais as variáveis independentes estudadas (idade, sexo, dosagem de NSE-L) de uma maneira conjunta foram fatores preditivos para o diagnóstico de derrame pleural maligno.

Tabela 19 – Predição para Diagnóstico de Líquido Pleural Maligno por Regressão Logística Múltipla

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	COEFICIENTES β	ODDS RATIO	IC 95%	RESULTADO
Idade (anos)	0,0448	1,045	1,01 – 1,07	P = 0,004
Sexo	-0,7065	0,493	0,14 – 1,68	P = 0,258
NSE-L ($\mu\text{g/L}$)	0,0248	1,025	1,00 – 1,04	P = 0,006

FONTE: Tabelas 5 e 6. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006). χ^2 ajustado igual a 18,62 ($p = 0,0001$) após exclusão do sexo

VI – DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A solicitação de um teste diagnóstico é uma das experiências mais rotineiras na prática médica. Os objetivos são vários, incluindo o diagnóstico de doenças. Não existe teste perfeito, isto é, aquele que com certeza absoluta determina a presença ou ausência da doença.

Assim, um dos objetivos específicos desse trabalho foi estudar os parâmetros (índices) nos quais o conceito de qualidade do teste da NSE-L possa ser determinado para o diagnóstico de derrame pleural maligno.

1) MÉTODO DE IMUNOFLUOROMETRIA A TEMPO RESOLVIDO (TRF) PARA DOSAGEM DA NSE-L

Diversos estudos utilizam outro método de laboratório para dosagem de atividade da NSE-L. Todos utilizam a técnica de ELISA ou radioimunoensaio e não foi encontrada na literatura pesquisa com dosagem de NSE-L pelo método de imunofluorometria a tempo resolvido (NYBERG et al., 1996; FERRER et al., 1999; ROMERO et al., 1989; LEE et al., 2005; ALATAS et al., 2001).

No presente trabalho foi dosada NSE-L usando a tecnologia do AutoDELFIA® NSE *kit*.

As análises foram duplas para cada amostra nesta pesquisa. Cabe mencionar que as análises de identificação duplas são, em geral, usadas em laboratórios clínicos, enquanto as análises triplas e quádruplas são utilizadas em pesquisa.

STERN e colaboradores (2007) compararam a *performance* de sete ensaios para NSE, incluindo o kit por imunofluorometria a tempo resolvido utilizado neste trabalho. Concluíram estes pesquisadores que as diferenças encontradas nos parâmetros avaliados eram devidos à discrepância entre a afinidade dos anticorpos para as isoenzimas alfa-gama e gama-gama da enolase, assim como para os valores de *cut-off* dos fabricantes.

2) VARIÁVEIS INDEPENDENTES PESQUISADAS (TABELAS 6, 7, 8, 9,10 e 11)

A média de idade dos pacientes com líquidos pleurais malignos foi de 67, 6 anos (35-92) com desvio padrão de 16,93 e coeficiente de variação de 25,2. A média de

idade dos pacientes com líquidos pleurais benignos (controles) foi de 49,3 anos (3 - 94) com desvio padrão de 25,6 e coeficiente de variação de 52,2 % (tabela 7)

Trabalho original de ALATAS e colaboradores (2001) examinou NSE-L em 74 pacientes com líquidos pleurais malignos (n = 44) e benignos (n = 30) através de um kit comercial de ELISA. Os líquidos pleurais malignos eram oriundos de 75% de pacientes do sexo masculino com média de idade de 55,0 anos (30 – 78). Os líquidos pleurais benignos eram oriundos de 70% de pacientes do sexo masculino com uma média de idade de 42,0 anos (18 – 72).

Neste trabalho em avaliação o sexo feminino teve maior freqüência nos líquidos malignos (55,0 %), ao contrário do sexo masculino que predominou nos líquidos pleurais benignos (60,0%), conforme resumo na tabela 7.

Neste trabalho em avaliação a média de atividade de dosagem da NSE-L nos líquidos pleurais malignos foi de 38,5µg/L (0,1 – 161,9), com desvio padrão de 54,6 e coeficiente de variação de 142,7% (tabela 7).

Neste trabalho em avaliação a média de atividade de dosagem da NSE-L nos líquidos pleurais benignos foi de 9,35 µg/L (0,1 – 161,1), com desvio padrão de 23,7 e coeficiente de variação de 254,4% (tabela 7).

Após estudo de normalidade gaussiana pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (tabela 8) foi comparado estatisticamente a média de atividade da NSE-L dos líquidos pleurais malignos com a média dos benignos deste trabalho (tabela 9). O resultado foi estatisticamente significativo ($Z = 2,16$; $p = 0,0304$).

O resultado das médias de dosagem por ELISA da NSE-L de cinquenta pacientes apresentadas por LEE et al., 2005 é praticamente idêntico aos resultados encontrados neste trabalho para líquidos pleurais malignos ($37,2 \pm 56,3$) e benignos ($9,2 \pm 7,2$).

O resultado das médias de dosagem por ELISA da NSE-L de 116 pacientes consecutivos apresentados por ROMERO e colaboradores (1989) também não são muito diferentes das médias encontradas neste trabalho para líquidos pleurais benignos ($8,7 \pm 7,1$). A média destes autores para líquidos pleurais malignos foi $25,0 \pm 27,4$. Cabe observar apenas os valores dos desvios padrões de ambos os trabalhos.

O principal diagnóstico diferencial para líquido pleural maligno no Brasil e em diversos países em desenvolvimento é tuberculose (SILVA JUNIOR et al., 2003).

Neste trabalho foi encontrada uma média de dosagem de NSE-L para tuberculose de $12,97 \mu\text{g/L}$ ($0,1 - 166,1$) com desvio padrão de $34,0$. Para líquidos pleurais malignos, a média de dosagem de NSE-L foi de $38,51 \mu\text{g/L}$ ($0,1 - 161,9$) com desvio padrão de $54,9$ (tabela 10).

No trabalho de ROMERO e colaboradores (1989) a média de dosagem de NSE-L para tuberculose pleural foi de $14,4 \pm 8,3 \mu\text{g/L}$.

Ainda na tabela 10, podemos observar que quando comparadas as diversas causas de líquidos pleurais da pesquisa elas foram, estatisticamente, significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($H = 16,33$; $p = 0,0121$). Após comparações *post-hoc* (tabela 11) foi concluído que somente o grupo dos transudatos contribuía, estatisticamente, para esta diferença ($Z = -3,10$; $p = 0,0019$). Não foi encontrado estudo na literatura pesquisada com tais resultados.

Na tabela 12 outras comparações *post-hoc* foram realizadas. Neste estudo os líquidos pleurais foram classificados em benignos e malignos. Estes últimos subdivididos em linfomas, NSCLC e neuroblastoma. Os grupos comparados e os resultados encontrados pelo teste *post-hoc* de Dunn foram os seguintes: doenças benignas vs NSCLC ($p < 0,01$), linfomas vs NSCLC ($p > 0,05$) e doenças benignas vs

linfomas ($p > 0,05$). Não foi encontrado estudo na literatura pesquisada com tais resultados.

3) FREQUÊNCIAS DAS CAUSAS DE LÍQUIDOS PLEURAIIS NA PESQUISA (TABELA 13)

Da análise da tabela 13, conclui-se que os diagnósticos mais freqüentes de síndrome do derrame pleural foram de tuberculose (33,0%), neoplasias malignas (29,0%), empiema pleural (10,0%) e transudatos (9,0%).

A experiência internacional cita os transudatos, doença maligna e o derrame pleural parapneumônico como os mais frequentes (LIGHT, 1995).

4) ESCOLHA DO LIMIAR CRÍTICO DISCRIMINATIVO (*CUT-OFF* OU LIMIAR DE REATIVIDADE OU PONTO DE CORTE OU VALOR DE REFERÊNCIA) DA NSE-L PARA DERRAME PLEURAL MALÍGNO E EXPRESSÃO DE FENÓTIPO NEUROENDÓCRINO NO LÍQUIDO PLEURAL PELO MÉTODO DE IMUNOFLUOROMETRIA A TEMPO RESOLVIDO

Os testes diagnósticos podem ser classificados em qualitativos e quantitativos. Os testes quantitativos classificam os indivíduos com e sem doença de acordo com valores acima ou abaixo de limiares de reatividade previamente selecionados em um teste diagnóstico.

a) CONTRABALANÇOS ENTRE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE (ARMITAGE e BERRY, 1994)

Para o diagnóstico de derrame pleural maligno, através do teste da NSE-L, foram experimentados diversos valores de limiares críticos discriminativos, conforme demonstrado pelo contrabalanço (*trade-off*) da tabela 14. Esses cálculos foram realizados para ser determinado a partir de qual valor quantitativo de atividade do teste da NSE-L, dosada pelo método de imunofluorometria a tempo resolvido, caso possa dizer que o exame foi positivo ou negativo (reagente ou não reagente).

Pelos cálculos da tabela 14, chega-se à conclusão que o valor acima ou igual a 28,5 µg/L, oferece eficiência máxima, isto é, 28,5 µg/L é o valor quantitativo que causa o menor número de falsos positivos e falsos negativos ou é o valor que apresenta maior eficiência.

A escolha do limiar de reatividade acima descrito somente é válido para a prevalência de derrame pleural maligno na casuística pesquisada. Outras casuísticas poderão considerar valores de limiar de reatividade mais elevados ou menos elevados, dependendo da prevalência de câncer e do tipo histológico na amostra estudada.

O teste da NSE-L pode, até mesmo, ser considerado ineficiente se a prevalência de câncer na casuística estudada for extremamente baixa.

Não foi encontrada na literatura pesquisa para determinar o valor de referência da NSE-L pelo método de contrabalanço.

b) CURVA ROC (Figura 1)

Uma outra maneira de avaliar um teste diagnóstico é por método gráfico. Essa maneira também decide qual o ponto de corte mais adequado (limiar crítico discriminativo ou de reatividade) de uma distribuição.

Um gráfico utilizado para esta finalidade é a chamada curva ROC (iniciais do original em inglês *receiver operating characteristic*), nome recebido porque o método originou-se em estudos de detecção de sinais por operadores de radar.

Pela análise da curva ROC sobre a dosagem da NSE-L nesse estudo (figura 1), observa-se que o ponto de corte ideal dos valores da NSE-L, isto é, aquele que mais se aproxima de maior sensibilidade e com menor número de falsos positivos (maior especificidade), é no limiar discriminativo de 14,3 µg/L.

O ponto ideal de corte é o mais próximo do ângulo do gráfico no canto superior esquerdo da curva ROC. Quanto mais a curva se afasta desse ponto, mais inadequado é o ponto de corte da distribuição (HULLEY et al., 2002).

As curvas ROC, além de auxiliarem na seleção do melhor ponto de corte de um teste diagnóstico, também podem ser utilizadas para comparar dois ou mais testes diagnósticos para uma mesma doença. Nesse caso, a acurácia de cada teste, em cada curva ROC, pode ser determinada das seguintes maneiras: a) método não-paramétrico através do cálculo da área trapezoidal sob a curva ROC (AUC – *area under curve*). Quanto maior a AUC melhor o teste; b) método paramétrico usando a razão de verossimilhança positiva máxima de cada ponto de corte.

A área abaixo da curva ROC está associada ao poder discriminante de um teste de diagnóstico. O valor mínimo da área sob a curva ROC é de 0,50 – representado graficamente como uma linha de 45° - quando as capacidades de previsão do teste não são superiores ao acaso puro, e o valor máximo é de 1,0 – representando o caso em que o teste possui capacidade preditiva perfeita (100% de verdadeiros-positivos e 0% de falsos-positivos).

Poucos estudos na literatura utilizaram a curva ROC para cálculo do ponto de corte do teste da NSE-L. LEE e CHANG (2005) utilizando curva ROC, encontraram uma sensibilidade de 36,4 % e uma especificidade de 93,8 % para um limiar discriminativo maior do que 20 ng/mL (método de ELISA) com uma AUC igual a 0,575.

No presente trabalho, utilizando um programa computadorizado denominado MedCalc v. 9 (2006) for Windows (software que possui um *Microsoft Gold Certified Partner*), a área calculada sob a curva ROC foi de 0,666 ou 66,6% (IC a 95% entre 0,544 e 0,775) que foi estatisticamente significativa ($p = 0,0265$).

c) CÁLCULO DA RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA POSITIVA (TABELA 15)

Apesar do poder da curva ROC e do método do contrabalanço, em selecionar um limiar de reatividade adequado para um determinado teste diagnóstico, o cálculo da razão de verossimilhança positiva (LR+) é um método mais poderoso porque estima a probabilidade da doença estar presente em qualquer nível de resultado do teste (FLETCHER, 1996).

Utilizando o maior valor de LR+ o ponto de corte maior ou igual a 126,5 µg/L também é o que tem maior LR+.

d) CÁLCULO PELO ODDS RATIO DIAGNÓSTICO (TABELA 16)

Pelos três métodos anteriores os valores de referência selecionados da NSE-L para diagnóstico de derrame pleural maligno foram iguais ou superiores a 28,5µg/L, 14,3µg/L e 126,5 µg/L, respectivamente. Recentemente, tem sido proposto na literatura (GLAS et al., 2003) um outro indicador para avaliar a *performance* de um teste diagnóstico. O cálculo do *odds ratio* diagnóstico (DOR).

O DOR, assim como o *odds ratio* (OR) na epidemiologia, pode ser aplicado para expressar a força de associação do resultado de um teste e a doença em que ele está sendo empregado para avaliação.

Considerando os resultados apresentados e explicados (cálculos anteriores para a escolha de um limiar de reatividade para o teste da NSE-L para diagnóstico de diferenciação neuroendócrina no líquido pleural maligno) foi selecionado como ideal pelos cálculos de DOR o ponto de corte maior ou igual a 28,5 µg/L.

SHIMOKATA e colaboradores (1989) selecionou o ponto de corte para NSE-L de sua pesquisa em 26,0 ng/mL [método de enzima imuno-ensaio (EIA) para dosagem da enzima]. Arbitrou tal valor com base apenas na média e desvio padrão de sua casuística para tuberculose pleural (25,4 ng/mL).

Não foi encontrada na literatura pesquisa para cálculo de valor de referência de NSE-L pelo método de DOR.

5. PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS DA NSE-L PARA MALIGNIDADE E PREDIÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA NO LÍQUIDO PLEURAL

Ao se estudar um novo teste diagnóstico, deve-se informar o grupo de pacientes que possuem a doença para a qual o teste está sendo estudado e o grupo de pacientes cujos testes são negativos, mesmo com a doença presente.

Das informações adquiridas deste estudo, são possíveis cálculos estatísticos para caracterizar o teste a ser estudado.

A formação do raciocínio diagnóstico consiste numa seqüência de decisões lógicas, cada uma produzindo conclusões intermediárias, durante a transformação progressiva da entrada de dados clínicos e laboratoriais, até se atribuir ao paciente uma determinada etiologia (FLETCHER et al., 1996; SACKETT et al., 2001).

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, prevalência, valor preditivo de um teste positivo e valor preditivo de um teste negativo são muito úteis na avaliação de um novo teste laboratorial (FLETCHER et al., 1996; SACKETT et al., 2001; HULLEY et al., 2001). Esses parâmetros definem a análise de desempenho do teste, isto é, a sua padronização. Este caminho vem sendo utilizado na medicina laboratorial, nos últimos trinta anos.

a) SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e a especificidade são as medidas que expressam a validade de um exame, isto é, sua qualidade intrínseca (MENEZES, 2001).

Sensibilidade e especificidade são propriedades inerentes a um teste diagnóstico e não variam muito, a não ser por mudanças na técnica de aferição ou por erros na sua aplicação.

A sensibilidade é um índice calculado na população com a doença e pode ser afetado pela gravidade da enfermidade e indiretamente pode sofrer influência da prevalência.

A especificidade, assim como a sensibilidade, também é um índice diretamente independente da prevalência da doença, pois é calculado somente com a população sem a doença.

No teste da NSE-L, para o diagnóstico de derrame pleural por câncer, sua especificidade nessa casuística foi calculada de uma maneira considerada ideal em termos estatísticos. Isto porque, nas amostras sem câncer, os pacientes tinham uma doença semelhante que também produzia líquido pleural e servia para o diagnóstico diferencial. Cada paciente, sem a doença câncer pleural, era um controle perfeito que reproduzia com exatidão o que é encontrado na prática clínica.

Os valores preditivos de um teste diagnóstico podem caminhar no sentido inverso ao da sensibilidade e especificidade, pois dependem diretamente de uma interação de três variáveis: a incidência de resultados falsos negativos, a incidência de resultados falsos positivos e a prevalência da doença na população estudada (SOX JR, 1986).

A prevalência da doença é, na realidade, uma probabilidade pré-teste de que a doença esteja presente (SOX JR, 1986).

Para o diagnóstico de líquido pleural maligno, cuja atividade da NSE-L foi dosada pelo método de imunofluorometria a tempo resolvido, e considerando-se um limiar de reatividade de 28,5 µg/L, resultados estatísticos demonstram que o índice de sensibilidade encontrado, nesta casuística, foi de 30,0%, com limites de confiança de 95,0% entre 9,9 e 50,1% (tabela 17).

Para os mesmos diagnósticos, o índice de especificidade encontrado, nesta casuística, para o exame da NSE--L, foi de 96,0%, com limites de confiança de 95,0% entre 90,6 e 101,4 (tabela 17).

O índice de sensibilidade variou entre 36,4 e 51% na literatura pesquisada e também no teste da NSE, com método de dosagem por ELISA e diferentes valores de referência. O índice de especificidade variou entre 74,0 e 93,8%, na literatura pesquisada.

Como referências para os dados acima, cita-se os seguintes autores com colaboradores: ROMERO (1989), LEE (2005).

FERRER e colaboradores (1999) não encontraram valor diagnóstico da NSE-L, dosada por radioimunoensaio, em 146 líquidos pleurais (43 malignos, 47 tuberculosos, 24 paramalignos e 32 benignos de causas diversas).

Cabe discutir que com o ponto de corte selecionado ($\geq 28,5 \mu\text{g/L}$) a sensibilidade do teste da NSE-L foi de 30,0 %, o que é considerado relativamente baixa para um diagnóstico. Entretanto, o ponto de corte selecionado conduz a uma especificidade do exame de 96,0 %. Esta especificidade é extremamente alta e muito útil para afastar os casos de falsos-positivos, principalmente, o principal diagnóstico diferencial na prática clínica (tuberculose pleural).

Com uma especificidade de 96 % qualquer resultado da NSE-L maior ou igual a $28,5\mu\text{g/L}$ conduz a uma probabilidade baixa de 4,0% de casos falsos-positivos. Em todas situações clínicas, o diagnóstico errado por um exame falso positivo é um erro muito mais grave do que um exame falso negativo.

Realmente, se observarmos na tabela 6, somente 2 (dois) casos dos controles apresentaram pontos de corte acima ou igual ao valor selecionado: um caso de empiema e um caso de tuberculose pleural.

A ausência de pessoas normais (sadias), no grupo controle (líquidos pleurais benignos), induz a conclusão que o exame da NSE-L será extremamente útil e importante na clínica diária.

Em face de sua alta especificidade é um exame válido para o diagnóstico diferencial na síndrome do derrame pleural.

Os testes diagnósticos altamente específicos são extremamente úteis, e necessários, porque um resultado falso positivo pode lesar o paciente tanto física, como emocional ou financeiramente.

b) VALORES PREDITIVOS (PROBABILIDADES PÓS-TESTE)

Ao contrário da sensibilidade e da especificidade, que são índices somente conhecidos depois do diagnóstico definitivo da doença estudada e medem a capacidade discriminativa do teste, os valores preditivos dizem quais são as probabilidades de um determinado paciente ter ou não doença sob suspeita. Refletem a capacidade de produzir decisões clínicas corretas (GRINER et al., 1981).

Deve-se lembrar que a interpretação do valor preditivo de um teste precisa ser cercada de cuidados, pois trata-se de uma questão de probabilidade e não de certeza, onde entram como variáveis os seguintes determinantes: a sensibilidade, a especificidade e a prevalência da doença para a qual o teste está sendo avaliado (SOX JR, 1986).

Os algoritmos e o raciocínio de probabilidades são métodos quantitativos para a tomada de decisões com o objetivo de chegar-se a determinado diagnóstico. O Reverendo Bayes, há mais de duzentos anos (1763) desenvolveu um modelo estatístico para definir-se a probabilidade de um paciente vir a ser um membro de uma classe particular (HENRY, 1995).

Em outras palavras, o valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade do paciente estar realmente doente quando o resultado do teste é positivo e o valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade do paciente não estar doente quando o resultado do teste é negativo (SOARES e SIQUEIRA, 2002).

O VPP da NSE-L na casuística (tabela 17) foi de 75,0 %, com limites de confiança a 95,0% entre 45,0 e 105,0%. Este dado revela a alta probabilidade de que um paciente com o teste ou exame da NSE-L positivo, isto é, acima do limiar crítico discriminativo calculado, tenha líquido pleural maligno.

Quanto maior a prevalência da doença maior o VPP do teste (SOARES e SIQUEIRA, 2002). Testes diagnósticos positivos em pacientes provenientes de casuística com alta prevalência da doença indicarão mais provavelmente a presença correta da doença (maior VPP), devido a menor índice de falsos-positivos (MENEZES, 2001).

O VPN da NSE-L na casuística (tabela 17), foi de 77,4 %, com limites de confiança a 95,0% entre 67,0 e 87,8 %, revelando a alta probabilidade de que um paciente com o teste negativo, isto é, abaixo do limiar crítico discriminativo estabelecido, não tenha líquido pleural maligno.

Conclui-se que, em sendo os valores preditivos do teste da NSE-L para o diagnóstico de líquido pleural maligno muito altos, estatisticamente, dispensa-se a associação de outros exames para o diagnóstico da doença em questão. Entretanto, clinicamente, um marcador tumoral sempre deve ser usado como um exame adjunto aos exames de citopatologia e histopatologia para diagnóstico da causa de uma neoplasia maligna.

A associação de exames para o diagnóstico de uma determinada doença justifica-se, estatisticamente, quando os valores de VPP e VPN são muito baixos ou quando um bom teste é muito caro ou oferece grande risco de complicações e/ou desconforto ao paciente (SOARES e SIQUEIRA, 2002).

No caso particular da NSE-L, um marcador tumoral e de diferenciação neuroendócrina com alto valor de especificidade e de VPP, é necessário a sua utilização para diagnóstico de malignidade em associação somente com um exame de baixo custo

financeiro e alta performance diagnóstica. A citopatologia pleural deve ser o exame escolhido porque possui baixo custo, alta sensibilidade e especificidade.

c) PREVALÊNCIA OU PROBABILIDADE PRÉ-TESTE

A utilidade de um teste diagnóstico varia em função da prevalência (probabilidade pré-teste) da doença que se quer diagnosticar (SOARES e SIQUEIRA, 2002).

Saber ou estimar a prevalência da doença é tão ou mais importante do que a relação sensibilidade/especificidade para o valor preditivo dos testes.

É muito importante que a prevalência de uma determinada doença seja considerada antes de sua pesquisa e posterior solicitação e realização pela prática clínica de um determinado exame/teste pelo laboratório.

A prevalência pré-teste de derrame pleural maligno para o teste da NSE-L neste estudo foi de 28,6 %, com limites de confiança a 95,0% entre 18,0 % e 39,2% (tabela 17).

d) EFICIÊNCIA DA NSE-L

Para o diagnóstico de líquido pleural maligno, o índice de eficiência ou proporção de acertos do teste da NSE-L, calculado da casuística (tabelas 5 e 6 com resumo na tabela 17), foi de 77,10 %, com limites de confiança a 95,0% entre 67,0 e 87,0 %.

5. RAZÕES DE VEROSSIMILHANÇA DA NSE-L

Likelihood ratio ou razão de verossimilhança ou razão de probabilidades indica em quantas vezes o resultado de um teste diagnóstico é capaz de mudar a probabilidade de se ter uma doença (FLETCHER et al., 1996).

Contrastando com os valores preditivos, os *likelihood ratios* não são influenciados pela prevalência da doença na casuística estudada. Um *likelihood* positivo (LR+), indica quanto a probabilidade da doença aumenta se o teste for positivo.

No caso específico da NSE-L (tabela 18), para o diagnóstico de derrame pleural maligno, o LR positivo calculado para o limiar de reatividade selecionado foi de 7,5. Para

que um exame tenha propriedade discriminativa, na identificação de uma determinada doença, o LR+ desta enfermidade precisa ser maior do que 1,0 (um). Valores mais altos indicam grande propriedade discriminativa (FLETCHER, 1996).

Um *likelihood* negativo (LR-), indica quanto a probabilidade da doença diminui em um paciente com um teste negativo. O LR – da NSE-L, na casuística mencionada, foi de 0,73 (tabela 18). O LR negativo da NSE-L menor do que 1,0 (um), indica grande poder discriminativo do exame, no caso de ausência da doença. Valores muito menores do que 1, indicam um poder discriminativo acentuado do teste (FLETCHER, 1996).

Qualquer paciente com NSE-L maior ou igual a 28,5 µg/L tem 7,5 vezes a mais de chance de ganhar um diagnóstico de derrame pleural maligno. Isto significa que para o ponto de corte estipulado a chance de um teste positivo ser verdadeiro é 7,5 vezes maior que a chance de ser falso.

6. INDICADOR KAPPA

O indicador kappa é um índice de validade que traduz a probabilidade de concordância entre o resultado do teste avaliado nos casos de câncer pleural e padrão áureo.

O valor encontrado de 0,32 (IC a 95% entre 0,02 e 0,61) – tabela 18 - traduz uma concordância razoável, segundo tabela de interpretação publicada por LANDIS e KOCH, 1977.

Essa maneira de expressar a confiabilidade de um teste diagnóstico é muito utilizada pelos epidemiologistas, mas não foi encontrado na literatura cálculo do indicador kappa para o teste da NSE-L.

7. ANÁLISE DA SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DO EXAME DA NSE-L ATRAVÉS DO TESTE χ^2 DE PEARSON

Da análise da casuística com o teste qui-quadrado de Pearson (tabela 17), obteve-se um valor de qui-quadrado elevado ($\chi^2 = 9,54$), o que assegura um valor de $p \leq$

0, 01, na comparação entre o grupo de pacientes com líquido pleural maligno e os controles diagnosticados pela NSE-L com o ponto de corte selecionado.

O valor de p encontrado para o cálculo do qui-quadrado demonstrou e concluiu estatisticamente serem altamente significantes os valores encontrados para o exame da NSE-L entre os pacientes com líquido pleural maligno e os com líquido pleural de outras causas.

O valor do qui-quadrado calculado assegura apenas que os valores encontrados para NSE-L não se devem ao acaso da amostragem. Não diz absolutamente nada do valor clínico do teste, nem a garantia de que erros sistemáticos de diagnóstico (viéses) importantes não tenham ocorrido no estudo.

Mais importante do que calcular um ou mais testes de significância, para o diagnóstico de líquido pleural maligno pelo teste da NSE-L, foi ter estabelecido os limites de confiança a 95% de probabilidade para os parâmetros de validade.

A validade de um teste refere-se à real situação refletida pelo resultado final, ou seja, se o resultado pode ser aceito como expressão da verdade ou quanto dele se afasta.

Em um teste diagnóstico, a questão a ser investigada e respondida, é a sua capacidade de discriminar corretamente doentes e sadios (SOX JR, 1986). No caso da NSE-L, existe validade, estatisticamente comprovada, para diagnosticar corretamente derrame pleural maligno e o diferenciar de outras causas.

8. SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA E SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA DO TESTE DA NSE-L PARA O DIAGNÓSTICO DE LÍQUIDO PLEURAL MALIGNO

Um valor é, estatisticamente, significativo se o valor de p é menor que um ponto de corte previamente estipulado, geralmente 0,05 (SOARES e SIQUEIRA, 2002). Um

resultado é, clinicamente, importante se for, estatisticamente significante, e dentro do intervalo de confiança estipulado (SOARES e SIQUEIRA, 2002).

Para o diagnóstico de líquido pleural maligno, os valores de sensibilidade, especificidade, preditivos e de probabilidade, encontrados para o exame da NSE-L, dosada pelo método de imunofluorometria a tempo resolvido, com determinação dos intervalos de confiança a 95%, atestam a sua validade clínica para o diagnóstico estudado.

A significância clínica do teste da NSE-L está diretamente relacionada com o impacto que os resultados podem causar quando aplicados na prática clínica.

9) ASPECTOS DA DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA PRESENTE NO TRABALHO

Os marcadores tumorais, como a NSE, não servem apenas para diagnóstico laboratorial, prognóstico e monitorização de tratamento em oncologia. Eles também possuem o significado de ajudar os pesquisadores a compreenderem a biologia de um tumor.

Está determinado por pesquisas experimentais que tumores neuroendócrinos do pulmão que expressam NSE e outros marcadores, têm sua origem em células epiteliais multipotentes das vias aéreas (FERRIGNO et al., 2003).

Entretanto, outras células também expressaram NSE. As mencionadas por HAIMOTO e colaboradores (1985), além dos neurônios, células neuroendócrinas e tumores neurogênicos e outros tumores, são: músculo liso, plaquetas, linfócitos B e T, alça de Henle, mácula densa dos rins, sistema condutor do coração, pneumócitos tipo II, células epiteliais dos brônquios (PNECs), etc.

O sistema pulmonar neuroendócrino consiste de células epiteliais endócrinas das vias aéreas associadas com fibras nervosas (HOMO-DELARCHE et al., 1993).

As células epiteliais pulmonares neuroendócrinas podem se apresentar solitárias (PNEC) ou agrupadas sob a forma de corpos neuroepiteliais (NEB).

Atualmente, os NEBs representam um grupo de receptores intraepiteliais que são capazes de funcionar com ações reflexas central e local, em relação a estímulos químicos e mecânicos, tais como hipóxia e nicotina, através de receptores sensitivos localizados na membrana (BROUNS, 2003).

As PNECs e os NEBs sintetizam, estocam e liberam grande variedade de substâncias bioativas, isto é, possuem uma estrutura e função endócrina. Também contribuem para redistribuição do fluxo sanguíneo pulmonar, regulação do tônus broncomotor, modulação da resposta imune, estimulação de fibras nervosas sensoriais, regulação do crescimento e desenvolvimento do pulmão, além da relação destas células com tipos específicos de câncer broncogênico (BROUNS, 2003).

Neste trabalho, encontramos na tabela 10 a comparação das diversas causas de líquidos pleurais estudados nesta pesquisa. Estas causas quando comparadas em conjunto foram estatisticamente significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ($H = 16,33$; $p = 0,0121$). Após comparações *post-hoc* (tabela 11) foi concluído que somente o grupo dos transudatos contribuía, estatisticamente, para esta diferença ($Z = - 3,10$; $p = 0,0019$). Qual a explicação para tal fenômeno? Por que um caso comprovado de tuberculose pleural forneceu atividade de NSE idêntica ao de diversos tipos histológicos de câncer pleural metastático? Como explicar a expressão de diferenciação neuroendócrina nestes casos?

Toda resposta celular pode ser definida em termos moleculares. Diferenciação pode ser determinada como a expressão gênica de um tecido específico (BLAGOSKLONNY, 2003).

O fato de que 70,0 % dos líquidos pleurais malignos (sensibilidade igual a 30,0 % - tabela 17) não apresentaram limiar de reatividade acima do ponto de corte selecionado pode ser explicado pela expressão do fenótipo para diferenciação neuroendócrina (NE).

Esta diferenciação não ocorre em todos os tipos de células tumorais. Em alguns casos, a diferenciação NE pode ocorrer, mas não existe a liberação da NSE para o meio extracelular (MENARD, 1993). Nestes casos, especificamente, o uso de coloração por imunocitoquímica com anticorpos monoclonais, em *cell block* de líquido pleural, poderia ajudar como complementação para o diagnóstico.

Os achados deste trabalho concluem que a utilização da NSE-L com propósito de diagnóstico de uma doença deve ser usado com cuidado. Não somente os carcinomas brônquicos (SCLC e NSCLC) e um caso de linfoma apresentam diferenciação neuroendócrina para diagnóstico laboratorial.

O achado de NSE-L pode traduzir alteração da função celular onde elas estão presentes como: alteração do metabolismo glicolítico, diferenciação celular ou imunomodulação (ROGERS et al., 1980; BLAGOSKLONNY, 2003)

Cabe lembrar que os transudatos são causas de síndrome do derrame pleural em que o líquido acumulado não resulta de lesão direta das superfícies pleurais. Portanto, não estão entre as suas células (mesotélio) diretamente comprometidas pela doença básica. Este é um aspecto importante para pesquisas futuras porque as células mesoteliais não expressam NSE (HURLIMANN, 1994).

10) ASPECTOS ORIGINAIS DA PESQUISA

Após revisão extensa da literatura e análise dos resultados desta pesquisa destaca-se como aspectos originais:

1) a dosagem de NSE no líquido pleural nunca foi realizada no Brasil com finalidade de pesquisa acadêmica;

2) não existe na literatura internacional cálculo de valor de referência para NSE-L por diversos métodos estatísticos padronizados para testes diagnósticos;

3) a dosagem de NSE no líquido pleural por imunofluorometria a tempo resolvido nunca foi realizada em trabalhos anteriores;

4) não existe na literatura pesquisas com referência ou inferência sobre um provável processo de diferenciação neuroendócrina na tuberculose pulmonar e pleural;

5) como não existiu tumor brônquico SCLC na casuística pesquisada, a expressão de NSE-L traduz o grau de diferenciação das células tumorais ou outras presentes no líquido e nas superfícies pleurais.

6) cálculo dos fatores preditivos para diagnóstico de líquido pleural maligno, por regressão logística múltipla, incluindo, além da NSE-L, a idade e o sexo dos pacientes como variáveis independentes (tabela 19). Nesta tabela pode ser observado pelos cálculos de análise multivariada que o sexo dos pacientes não é um fator preditivo, estatisticamente, significativo para predição do diagnóstico.

11) PERSPECTICAS FUTURAS

O presente trabalho conduz às seguintes perspectivas futuras sobre a diferenciação neuroendócrina no líquido pleural e sobre o real significado da dosagem da NSE-L como marcador tumoral pleural e predição de diferenciação neuroendócrina:

1) a NSE-L deverá fazer parte dos exames diagnósticos diferenciais para a causa da síndrome do derrame pleural. A alta especificidade encontrada conduz ao seu uso com segurança como exame diagnóstico auxiliar para a neoplasia pleural;

2) a imunofluorometria a tempo resolvido é um método de dosagem que poderá constar da rotina de avaliação da NSE no líquido pleural;

3) Pesquisas futuras deverão ser realizadas para avaliar a expressão neuroendócrina real dos linfomas pulmonares e o derrame pleural decorrente (paramaligno ? metastático ?) com o marcador NSE e com outros específicos.

O trabalho de BANNER e colaboradores (1986) concluiu que não existe expressão neuroendócrina neste tumores.

Neste trabalho, os linfomas contribuíram com uma freqüência de 20,0 % (4/20) sobre todos os casos de líquido pleural maligno. Pesquisa original de NEMETH e colaboradores (1987) encontrou que em 23 linfomas examinados por anticorpo policlonal para NSE, 48,0 % apresentaram reação positiva pela imuno-histoquímica independente do tipo histológico e do fenótipo. No trabalho atual em exame, 25% dos casos de linfomas (um em quatro casos avaliados) apresentaram dosagem de NSE-L acima de qualquer valor de referência calculado.

4) utilização da NSE como predição de diferenciação neuroendócrina no líquido pleural. Trabalho original de BRAMBILLA e colaboradores (1992) levou à conclusão de que a dosagem bioquímica da NSE foi semelhante à imuno-histoquímica para moléculas de adesão neural em câncer de pulmão.

5) o ponto de corte ou valor de referência selecionado de 28,5 µg/L deve ser o escolhido para limiar de reatividade da NSE no líquido pleural. A maioria dos trabalhos da literatura utiliza como valor de referência o mesmo preconizado para o soro pelo fabricante dos kits ou método estatístico incorreto de seleção (SHIMOKATA et al., 1989). Entretanto, em se tratando de um teste diagnóstico é aconselhável que cada laboratório tenha o seu valor de referência para a sua potencial casuística.

6) Qual o grau de diferenciação neuroendócrina em pacientes fumantes ou com outras doenças pulmonares não malignas no Brasil? A atividade de NSE ou outro marcador neuroendócrino detectado precocemente no soro e/ou líquido de lavado broncoalveolar poderia ser um preditor de doença maligna nestes pacientes?

Trabalho original de COLLAZOS e colaboradores (1994) realizado na Espanha concluiu que o aumento de expressão da NSE no soro de pacientes com doenças pulmonares benignas poderia ser causado pela lesão direta das PNECs ou por algum grau de hipóxia local. A tuberculose pulmonar contribuiu com 27,3 % para expressão de NSE neste grupo de pacientes.

7) Qual a origem da NSE presente no líquido pleural exsudativo maligno e não-maligno?

A origem parece não ser do soro porque em todos os trabalhos originais de pesquisa cujos pacientes foi realizada a dosagem de NSE, simultânea, em soro e líquido pleural apresentaram níveis mais elevados da enzima no líquido pleural.

A resposta para esta pergunta abre um outro campo para pesquisas futuras porque já sabemos que células malignas e não malignas podem expressar NSE. A origem pode ser das próprias células malignas implantadas nas superfícies pleurais por ocasião das metástases. A origem pode ser também das hemácias, plaquetas e linfócitos presentes no exsudato pleural. A origem pode, até mesmo, ser das células de Langerhans presentes

por ocasião do implante dos granulomas que surgem no mesotélio pleural após instalação da imunidade celular para tuberculose pleural.

Trabalho original de FANTINI e colaboradores (1991) concluiu que células de Langerhans de epitélio humano normal expressam reação para NSE por imunoperoxidase.

VII - CONCLUSÕES

Após análise da casuística, resultados e discussão, e de acordo com os objetivos propostos, foi concluído que:

1 – a enzima enolase neurônio-específica é útil para diagnóstico diferencial de líquidos pleurais benignos e malignos e como marcador de diferenciação neuroendócrina pleural dosada através do método de imunofluorometria a tempo resolvido;

2 – o limiar crítico discriminativo calculado do exame da enolase neurônio-específica pleural para o diagnóstico de derrame pleural maligno foi de 28,5 µg/L, pelos métodos estatísticos de contrabalanço e de odds ratio diagnóstico;

3 – Para uma prevalência pré-teste de 28,6%, os parâmetros de padronização e discriminação do teste da enolase neurônio-específica no líquido pleural, no limiar crítico discriminativo determinado, para o diagnóstico de derrame pleural maligno foi sensibilidade de 30,0%; especificidade de 96,0%; valor preditivo positivo de 75,0%; valor preditivo negativo de 77,0%; eficiência de 77,1%; razão de verossimilhança positiva de 7,5 e razão de verossimilhança negativa de 0,32;

4 – O tipo histológico com líquido pleural maligno metastático mais freqüente na casuística estudada foi o adenocarcinoma (60,0% ou 12/20). Não existiu casos de *small cell lung cancer*

5 - Os fatores preditivos para derrame pleural maligno, em modelo de análise multivariada por regressão logística múltipla, foram as variáveis independentes idade dos pacientes e dosagens quantitativas de enolase neurônio específica em líquido pleural.

VIII – REFERÊNCIAS

(International Committee of Medical Journal Editors, 1997)

01) Adriaensen D, Scheuermann. Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *The Anatomical Record* 1993; 236: 70 - 86.

02) Aguayo SM, Miller Y, Waldron Jr J, Bogin R, Sunday M, Staton Jr G, Beam W, King Jr T. Idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells and airways disease. *N Engl J Med* 1992; 327:1285-1288.

03) Aguayo SM. Determinants of susceptibility to cigarette smoke. Potential roles for neuroendocrine cells and neuropeptides in airway inflammation, airway wall remodeling, and chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(6): 1692-1698.

04) Akoun GM, Scarna HM, Milleron BJ, Benichou MP, Herman DP. Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy for small cell lung cancer. *Chest* 1985;87:38-43.

05) Alatas F, Alatas O, Metintas M, Colak O, Harmanci E, Demir S. Diagnostic value of CEA, CA 15-3, CA19-9 e CYFRA 21-1, NSE and TSA assay in pleural effusions. *Lung Cancer* 2001; 31: 9-16.

06) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4 th ed. Garland Science/Taylor & Francis Books Inc; 2002.

07) Alshehri M, Cutz E, Banzhoff A, Canny G. Hiperplasia of pulmonary neuroendocrine cells in a case of childhood pulmonary emphysema. *Chest* 1997; 112 (2): 553-556.

08) Armitage P, Berry G. *Statistical Methods in Medical Research*. Third edition. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1994.

09) Astron A. *Manual Ilustrado de Anestesia Local*. Primeira edição. Rio de Janeiro: EPUME, 1987.

10) Avadhanam K, Plopper C, Pinkerton K. Mapping the distribution of neuroepithelial bodies of the rat lung. A whole-mount immunohistochemical approach. *Am J Pathol* 1997; 150:851-859.

11) Banner BF, Warren WH, Gould VE. Cytomorphology and marker expression of malignant neuroendocrine cells in pleural effusions. *Acta Cytol* 1986; 30 (2): 99-104.

12) Blagosklonny MV. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order. *Seminars in Cancer Biology* 2003; 13: 97-105

13) Boers J, den Brok J, Koudstaal J, Arends J, Thunnissen F. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:758-763.

14) Boyer PD. *The Enzymes*. 1 st edition. New York: Academic Press; 1971.

15) Braga ACO. Estudo do antígeno carcinoembrionário no diagnóstico dos derrames pleurais [dissertação de mestrado]. Niterói (Rio de Janeiro): Universidade Federal Fluminense; 1990.

- 16) Brambilla E, Veale D, Moro D, Morel F, Dubois F, Brambilla C. Neuroendocrine phenotype in lung cancers. Comparison of immunohistochemistry with biochemical determination of enolase isoenzymes. *Am J Clin Pathol* 1992; 98(1): 88-97.
- 17) Brouns I. Dual sensory innervation of pulmonary neuroepithelial bodies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(3): 275-285.
- 18) Callegari-Jacques SM. Bioestatística – Princípios e Aplicações. 1^a ed. Porto Alegre (Brasil): Artmed Editora; 2003.
- 19) Capelozzi VL, Ab'saber AM, Silva AG, et al. Minimum requirements for the anatomopathological report in lung cancer: justifications in the pathogenesis. *J Pneum* 2002; 28 (4): 201-218.
- 20) Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC, Bunn Jr. PA, Cohen MH, Minna JD, et al. Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small cell lung cancer. *Lancet* 1982;13: 583-585.
- 21) Christopoulos TK, Diamandis EP. Enzymatically amplified time-resolved fluorescence immunoassay with terbium chelates. *Anal Chem* 1992; 64(4): 342-346.
- 22) Cibas ES, Ducatman BS. Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996.
- 23) Collazos J, Esteban C, Fernandez A, Genolla. Measurement of the serum tumor marker neuron-specific enolase in patients with benign pulmonary diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150 (1): 143-145.
- 24) Cole GA, Polak JM, Wharton J, Marangos PJ, Pearse AGE. Neuron specific enolase as a useful histochemical marker for the neuroendocrine system of the lung. *J Pathol* 1980;132:351-352.
- 25) Day R, Salzet M. The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 (5-6): 447-451.
- 26) DIAMANDIS EP. Immunossays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. *Clin Bioch* 1988; 21 (3): 139-150.
- 27) Ernst A, Silvestri GA, Johnstone D. Interventional Pulmonary Procedures. Guidelines from the American College of Chest Physicians. *Chest* 2003; 123:1693-1717.
- 28) Esscher T, Steinholtz L, Bergh J, Nöu E, Nilsson K, Pählman S. Neurone specific enolase: a useful diagnostic serum marker for small cell lung carcinoma of the lung. *Thorax* 1985;40:85-90.
- 29) Fantini F, Pincelli C, Sevignani C, Baraldi A, Giannetti. Langerhans cells can express NSE immunoreactivity. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 10-12.
- 30) Ferrer J, Villarino MA, Encabo G, Felip E. Diagnostic utility of CYFRA 21-1, CEA, CA 125, NSE and squamous cell antigen level determinations in the serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Cancer* 1999; 86 (8): 1488-1495.

- 31) Ferrigno D, Buccheri G, Giordano C. NSE Is An Effective Tumour Marker In Nscl. Lung Cancer 2003; 41: 311-320.
- 32) Fletcher RH, Fletcher Sw, Wagner Eh. Clinical Epidemiology: The Essentials. Baltimore (Usa): Williams & Wilkins; 1996.
- 33) Flieder DB. Neuroendocrine Tumors Of The Lung: Recent Developments In Histopathology. Curr Opin Pulm Med 2002; 8(4): 275-280.
- 34) Gazdar AF, Kadoyama C, Venzon D. The association between histologic type and neuroendocrine differentiation on drug sensitivity of lung cancer cell lines. J Natl Cancer Inst 1992;13:191-196.
- 35) Ginsberg RJ, Vokes EE, Raben A. Cancer of the lung. In: Devita JR, et al, editors. Cancer: principles and practices of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997;658-677.
- 36) Giusti G. Adenosine deaminase. In: H.U. Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis v.2, 2nd Ed. Academic Press: N.Y. 1974;1092-1099.
- 37) Glas AS, Lijmer JG, Prins MH. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. J Clin Epidemiol 2003; 56: 1129-1135.
- 38) Griner PF, Mayewshi RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnosis tests and procedures. Ann Intern Med 1981; 94: 553-600.
- 39) Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. Cancer 2008; 113 (1): 5-21.
- 40) Haimoto HY, Takahashi Y, Koshikawa T, Nagura H, Kato K. Immunohistochemical localization of γ -enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. Lab Invest 1985; 52: 257-263.
- 41) Hair Jr JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Multivariate Data Analysis. 5th edition. USA (New Jersey): Prentice-Hall, Inc; 1998.
- 42) Heath D, Smith P, Gosney J, Mulcahy D, Fox K, Yacoub M, Harris P. The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension. Br Heart J 1987; 58:204-213.
- 43) Heffner JE. Evaluating diagnostic tests in the pleural space: differentiating transudates from exsudates as model. Clin Chest Med 1998; 19(2): 277-293.
- 44) Henry JB. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods. 18th ed. New York: W.B. Saunders Company, 1995.
- 45) Homo-Delarche F, Dardenne M. The neuroendocrine-immune axis. Springer Semin Immunopathol 1993; 14: 221-238.
- 46) Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, NewmanTB. Designing clinical research: an epidemiologic approach. Baltimore (USA): 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- 47) Hurlimann J. Desmin and neural marker expression in mesothelial cells and mesotheliomas. Human Pathol 1994; 25: 753-757.

- 48) Ijsselstijn H, Gaillard J, De Jongste J, Tibboel D, Cutz E. Abnormal expression of pulmonary bombesin-like peptide immunostaining cells in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 1997; 42:715-720.
- 49) Innotrac Diagnostics. What is non-enhancement time-resolved fluorometry. [cited in 2003]. **Disponível em:** <http://www.innotrac.fi>
- 50) Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. [citado em 2008]. Disponível em: <http://www.inca.org.br>.
- 51) Ito T, Udaka N, Okudela K. Mechanisms of neuroendocrine differentiation in pulmonary neuroendocrine cells and small cell carcinoma. *Endocrine Pathol* 2003; 14 (2): 133-139.
- 52) Johnson DH, Marangos PJ, Forbes JT, Hainsworth JD, van Welch R, Hande KR, et al. Potential utility of serum neuron-specific enolase levels in small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1984; 44:5409-5414.
- 53) King K, Torday J, Sunday M. Bombesin and [Leu⁸]phyllolitorin promote fetal mouse lung branching morphogenesis via a receptor-mediated mechanism. *Develop Biol* 1995; 92:4357-4361.
- 54) Koss LG. *Diagnostic Cytology and the Histopathologic Bases*. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Co, 1992.
- 55) Kvetnoy IM. Neuroimmunoendocrinology: Where is the field for study? *NEL* 2002; 23 (2): 119-120.
- 56) Landis RJ, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1): 159-174.
- 57) Langley K. The neuroendocrine concept today. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 733: 1-17.
- 58) Lee JH, Chang JHC. Diagnostic utility of serum and pleural fluid carcinoembryonic antigen, neuron-specific enolase, and cytokeratin 19 fragments in patients with effusions from primary lung cancer. *Chest* 2005; 128: 2298-2303.
- 59) Levine H, Metzger W, Lacera D, Kay L. Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. *Arch Intern Med* 1970; 126:269-271
- 60) Light RW. *Pleural diseases*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
- 61) Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, et al. Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exsudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-509
- 62) Marangos PJ, Gazdar AF, Carney DN. Neuron-specific enolase in human small cell carcinoma cultures. *Cancer Lett* 1982;15:67.
- 63) Marangos PJ, Zomzely-Neurath C, Goodwin FKJ. Structural and immunological properties of neuron specific protein (NSP) from rat, cat and human brain: comparison to bovine 14-3-2. *J Neurochem* 1977; 28 (5):1097-1107.

- 64) Menard O, Dousset B, Jacob C, Martinet Y. Improvement of the diagnosis of the cause of pleural effusions in patients with lung câncer by simultaneous quantification of CEA and NSE pleural levels. *Eur J Cancer* 1993; 29A (13): 1809-1993.
- 65) Menna-Barreto SS. O desafio de diagnosticar tromboembolia pulmonar aguda em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneum* 2005; 31(6): 528-539.
- 66) Menezes AMB. *Epidemiologia das Doenças Respiratórias*. 1ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Revinter; 2001.
- 67) Miller R, Müller N. Neuroendocrine cell hyperplasia and obliterative bronchiolitis in patients with peripheral carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol* 1995; 19:653-658
- 68) Motta VT, Wagner NB. *Bioestatística*. Primeira Edição. Caxias do Sul: EDUCS, 2003.
- 69) Moore BW, McGregor T. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem* 1965; 240:1647-1653.
- 70) Morrone N, Meirelles Jr A, Rodrigues. Exames bioquímicos de líquido pleural – Adição de anticoagulantes, conservação em geladeira e retardo de 24 h para a realização não influenciam os resultados. *J Pneum* 1996; 22 (4): 181-184.
- 71) Murphy GP, Lawrence Jr W, Lenhard Jr R. *Oncologia Clínica*. Manual de La American Cancer Society. Segunda edición. Washington, DC: OPS, 1996.
- 72) Nemeth J, Galian A, Mikol J. NSE and malignant lymphomas (23 cases). *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987; 412 (1): 89-93.
- 73) Neves DD, Silva Junior CT, Chibante AM. Derrame pleural. In: Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. *Pneumologia: prática e atual*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2001. p. 185-199.
- 74) Nyberg P, Soderblom T, Pettersson T, Riska H, Klockars M, Linko L. Neurone-specific enolase levels in pleural effusions in patients with rheumatoid arthritis. *Thorax* 1996; 51 (1): 92-94.
- 75) Pan QR, Zhang X, Xu ZF et al. Significance of combined determination of CK 19mRNA, carcinoembryonic antigen, neuron-specific enolase, and tissue polypeptide antigen in peripheral blood of patients with lung cancer. *Ai Zheng* 2002; 21 (2): 196-199.
- 76) Papanicolau GN. *Atlas of Exfoliative Cytology*. Cambridge: Harvard University Press, 1963.
- 77) Peao MN, Aguas AP, Grande NR. Cellular kinetics of inflammation in the pleural space of mice in response to the injection of exogenous particles. *Exp Lung Res* 1992; 18(6): 863-876.
- 78) Pearse AGE. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 1969; 17: 303-313.
- 79) Rogers PA, Brenton DP, Hopkinson DA. Changes in the activity and isozyme patterns of glycolytic enzymes during stimulation of human lymphocytes with phytohaemagglutinin. *Ann Hum Genet* 1980; 43(3):213–226.

- 80) Romero S, Izquierdo M, Mauri M. Diagnostic usefulness of neurospecific enolase determination in pleural fluid. *Med Clin (Barc)* 1989; 93 (15): 568-571.
- 81) Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. Evidence-based medicine: how to practice and teach EBM. USA: Elsevier Health Sciences, 2001.
- 82) Salzet M. Immune cells express endocrine markers. *NEL* 2002; 23 (1): 8-9.
- 83) Salzet M, Day R. Endocrine markers of cellular immunity: defining the endocrine phenotype. *J Soc Biol* 2003; 197 (2): 97-101.
- 84) Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M. Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 1978;276:834-836.
- 85) Shenberger J, Shew R, Johnson D. Hyperoxia-induced airway remodeling and pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia in the weanling rat. *Pediatr Res* 1997; 42:539-544.
- 86) Shimokata K, Niwa Y, Yamamoto M, Sasou H, Morishita M. Pleural fluid NSE. A useful diagnostic marker for SCLC pleurisy. *Chest* 1989; 95 (3): 602-603.
- 87) Silva Junior CT, Cardoso GP. Endocrine expression in bronchogenic carcinoma. *Rev Port de Pneum* 2003; IX (2): 109-115.
- 88) Silva Junior CT. Adenosina Desaminase: Importância Clínica nos Derrames Pleurais [tese de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense, 1987.
- 89) Silva Junior CT, Cardoso GP, Braga ACO. Antígeno carcinoembrionário pleural: casuística do Hospital Universitário Antônio Pedro (1993-1998). *Pulmão RJ* 2004; 13 (1): 13-18.
- 90) Silva Junior CT, Cardoso GP, Souza JBS, Alencar RA, Monteiro EA. Prevalência de tuberculose pleural no ambulatório de pleurologia do Hospital Universitário Antônio Pedro. *Pulmão RJ* 2003; 12 (4): 203-207.
- 91) Soares JF, Siqueira AL. Introdução À Estatística Médica. 2ª Ed. Belo Horizonte(MG): Editora Coopmed; 2002.
- 92) Stern P, Bartos V, Uhrova J, Bezdichova D, Vanickova Z. Performance characteristics of seven neuron-specific enolase assays. *Tumour Biol* 2007; 28(2): 84-92.
- 93) Sox Jr H. Probability theory in the use of diagnostic tests. An introduction to critical study of the literature. *Ann Intern Med* 1986; 104: 60-66.
- 94) Spiegel MR. Schaum's Outline of Theory and Problems of Statistics. Second ed. New York: Mc Graw Hill, 1994.
- 95) Takagaki TY. Marcadores tumorais em carcinoma broncogênico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1992.
- 96) Tapia FJ, Polak JM, Barbosa AJA, Bloom SR, Marangos PJ, Dermody C, et al. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet* 1981;1:808-811.
- 97) Toni R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *J Endocrinol Invest* 2004; 27 Suppl (6): 35-47.

- 98) Ulbrich-Kulczynski JM. Estudo Imuno-Histoquímico de 473 Casos de Carcinomas Não de Pequenas Células do Pulmão [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
- 99) Vitiello N. Redação e Apresentação de Comunicações Científicas. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 1999.
- 100) Weigent DA, Blalock E. Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Neuroimmunoendocrinol* 1997; 69: 1-30.
- 101) WHO. Histological typing of lung tumors, vol. 1. 3rd ed. International Histological World Health Organization. Histological typing of lung tumors. Geneva: WHO, 1999; 1 (International Histological Classification of tumors, 1).
- 102) Youngson C, Nurse C, Yeger H, Cutz E. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* 1993; 365:153-155.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)