

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

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

Carlos Soares<sup>1</sup>, Herberto Bettencourt<sup>2</sup>, John Preto<sup>3</sup>, Paula Soares<sup>4</sup>, J. Pinto-de-Sousa<sup>5</sup>, A. Taveira Gomes<sup>6</sup>, J. Costa Maia<sup>7</sup>, José Manuel Lopes<sup>8</sup>

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

<sup>2</sup> Interno Complementar de Anatomia Patológica do Serviço de Anatomia Patológica do H.S.J.;

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

<sup>4</sup> Professora Associada da FMUP; Investigadora Sénior do Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP);

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

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

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

<sup>8</sup> Chefe de Serviço de Anatomia Patológica do H.S.J.; Professor Associado de Anatomia Patológica da FMUP; Investigador Sénior do IPATIMUP.

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

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

### RESUMO

**Introdução:** A angiogénese desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral e progressão neoplásica. A inibição da angiogénese associa-se a diminuição do crescimento e da metastização tumoral numa variedade de neoplasias. O anticorpo monoclonal CD105 (endoglina) identifica o receptor do factor transformador do crescimento  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), que é expresso nas células endoteliais da angiogénese tumoral. **Material e Métodos:** Foram incluídos no estudo 39 casos com GEP-NETS, submetidos a cirurgia de ressecção e/ou biópsia, seguidos e tratados no Hospital de São João do Porto, EPE. (H.S.J.), desde Janeiro de 1978 até Dezembro de 2006. Foram avaliadas as seguintes características em cada caso: localização; modo de apresentação; estadiamento clínico; tipo de ressecção; dimensão; metastização ganglionar; metastização à distância; índice Ki-67; imunorreactividade para CD105 e CD31 e sobrevida. Foi efectuado um “tissue microarray” (TMA) das áreas representativas dos tumores. Após realização do estudo imuno-histoquímico para o CD105, CD31 e Ki-67 foram seleccionadas por 2 observadores 3 áreas da neoplasia com maior número de microvasos (“hot spots”) e efectuado contagens de microvasos / campo de grande ampliação (x400 - 0.15mm2). **Resultados:** Os doentes apresentavam a idade mediana de 42 anos no momento do diagnóstico (extremos etários: 8 – 81 anos de idade). 18 doentes (46,2%) eram do sexo masculino e 21 (53,8%) do sexo feminino. A frequência relativa por órgão foi: estômago (2,6%); duodeno (5,1%); pâncreas (15,4%); intestino delgado (10,2%); apêndice ileocecal (64,1%) e cólon (2,6%). 84,6% dos doentes apresentavam doença localizada, 10,3% doença locorregional e 5,1% metástases à distância no momento do diagnóstico. A mediana do tempo de seguimento dos 39 doentes foi de 118 meses (extremos: 0 – 273 meses). Os doentes com tumores neuroendócrinos com metastização ganglionar ou à distância apresentaram um prognóstico significativamente pior relativamente a doentes sem metastização ( $p < 0,005$ ). Não foram verificados microvasos com expressão de CD105 nos tecidos sem neoplasia.

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

#### PALAVRAS-CHAVE

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

#### ABSTRACT

*Introduction: Angiogenesis has an important role in tumor growth and metastasis and angiogenic inhibition is associated with an inhibition of tumor progression in a variety of tumors. The role of anti-angiogenic agents in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) remains to be established. The monoclonal antibody CD105 (endoglin) identifies the transforming growth factor receptor  $\beta 1$  (TGF $\beta$ -1) which is expressed on endothelial cells involved in tumor angiogenesis. Patients and Methods: 39 patients with GEP-NETs who underwent surgery or biopsy, treated and followed at Hospital de São João do Porto, EPE. (H.S.J.), from January 1978 to December 2006, were included in the study. We evaluated the following clinical and pathological variables for each tumor: localization; presentation form; stage; type of resection; size; presence of lymph node metastasis; presence of distant metastasis; proliferation index (Ki-67); immunoreactivity to CD105 and CD31 and overall survival. A tissue microarray of tumor representative areas was made. After the immuno-histochemical assay for CD105, CD31 and Ki-67, three areas of the tumor with the largest number of micro-vessels ("hot spots") were chosen and the number of micro-vessels per large magnification field ( $\times 400 - 0.15\text{mm}^2$ ) was determined. Results: Median age at diagnosis was 42 (extremes of age: 8 – 81 years). 18 patients (46.2%) were men, 21 (53.8%) were women. Relative frequencies by organ, were: stomach (2.6%); duodenum (5.1%);*

pancreas (15.4%); small intestine (10.3%); appendix (64.1%) and colon (2.6%). 84.6% of the patients had localized disease at presentation, 10.3% lymph node metastasis and 5.1% distant metastasis. Median follow-up was 118 months (extremes: 0 – 273 months). Patients with GEP-NETs with lymph node or distant metastasis had a significantly worse prognosis relatively to patients without metastasis ( $p < 0.005$ ). We didn't identify micro-vessels with CD105 expression in non-neoplastic tissue. We observed statistically significant differences in microvessel density, determined by CD105 expression, when considering the organ involved by the tumor ( $p = 0.03$ ) and tumor stage ( $p = 0.024$ ). Microvessel density of the tumors, determined by CD105 expression, had a significant impact on survival ( $p < 0.005$ ). Vascular density, determined by CD31 expression, also demonstrated statistically significant differences when considering the organ involved by the tumor ( $p = 0.02$ ) and tumor stage ( $p = 0.014$ ). Tumors with lymph node metastasis and / or distant metastasis had a higher vascular density, determined by CD31 expression, when compared to localized tumors ( $p = 0.01$ ). Vascular density of the tumors also had a significant impact on survival ( $p < 0.005$ ). Discussion and Conclusions: In our study, CD105 was expressed in early stages and expression seemed to increase with tumor progression. The significant association found between microvessel density and overall patient survival seems to give biological relevance to endoglin in GEP-NETs. Vascular density, determined by CD31 expression, as microvessel density, determined by CD105 expression, of the tumors of our study, had a significant association with tumor stage and patient survival. An adequate clarification of this redundancy of angiogenic mechanisms may help explain the therapeutic results published in the literature, namely the clinical trials with angiogenic inhibitors in GEP-NETs. It is essential to organize multicentric studies involving angiomics and selective microarrays, to evaluate the reproducibility of our results and the importance of microvessel / vessel density as a response marker to angiogenic inhibitors in patients with GEP-NETs.

#### KEYWORDS

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

## INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos gastroentero-pancreáticos (GEP-NETs) constituem aproximadamente 2% das neoplasias do sistema gastro-intestinal<sup>1</sup>. A raridade dos GEP-NETs dificulta o seu diagnóstico e o estabelecimento de estratégias terapêuticas adequadas.

Classicamente, os tumores neuroendócrinos do tubo digestivo eram designados como *carcinóides*, com exceção dos tumores neuroendócrinos do pâncreas, independentemente da sua topografia, produção hormonal ou agressividade biológica. A inclusão no

mesmo grupo de tumores com comportamentos biológicos diferentes tornou evidente a limitação desta designação, especialmente na aplicação eficiente de esquemas de tratamento adequados<sup>2</sup>. Em 2000 e 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação mais compreensiva, baseada na diferenciação tumoral e nas características clínico-patológicas específicas da localização anatómica dos GEP-NETs. A designação carcinoma neuroendócrino é introduzida para os tumores clinicamente malignos. No entanto, esta classificação da OMS, revelou deficiências na avaliação prognóstica dos doentes com GEP-NETs. Mais

recentemente, a European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS), publicou propostas de estadiamento (TNM) para os GEP-NETs<sup>3,4</sup>. Este sistema de classificação poderá permitir uma melhor avaliação do prognóstico e consequentemente dos esquemas de tratamento destes tumores. No entanto, ainda está dependente de estudos clínico-patológicos adequados de validação.

Alguns dos mecanismos genéticos de regulação celular envolvidos na iniciação e progressão dos GEP-NETs já foram identificados: factores de transcrição; via da p53; regulação da reparação e replicação do DNA; vias de sinalização de receptores com afinidade cinásica da tirosina (RTK) e via do factor induzido pela hipoxia (HIF) - como resposta à hipóxia e angiogénese<sup>5,6,7</sup>.

A única forma de tratamento potencialmente curativa, continua a ser a cirurgia com remoção completa dos tumores localizados e loco-regionais<sup>2,8</sup>.

A expressão de receptores de somatostatina tem sido uma área de interesse nos GEP-NETs, devido à sua aplicação na imagiologia e na terapêutica destes tumores<sup>9,10,11</sup>. Outras formas de tratamento médico incluem a terapêutica biológica com interferão alfa e a quimioterapia<sup>8</sup>. A natureza altamente vascular dos TNEs motivou um interesse na inibição angiogénica como opção terapêutica<sup>8</sup>.

A angiogénese providencia o fornecimento de oxigénio e nutrientes adaptados às alterações metabólicas dos tecidos. A angiogénese disfuncional está na origem de muitas entidades nosológicas<sup>12</sup>.

A angiogénese pode resultar de alterações genéticas ou ser induzida por alterações locais, nomeadamente hipoxia, défices de glucose ou *stress* mecânico e/ou oxidativo. Múltiplas alterações genéticas estão relacionadas com perturbações da angiogénese: o *RAS*, *MYC*, *RAF*, *HER-2/neu*, *c-JUN* e *SRC* aumentam a expressão do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e/ou diminuem a expressão de trombospondina-1 (TSP-1)<sup>13,14,15,16</sup>.

A angiogénese neoplásica é diferente da angiogénese fisiológica: os neovasos neoplásicos são irregulares, tortuosos, hiperpermeáveis e apresentam *shunts* arterio-venosos anómalos. Estas alterações causam fluxo sanguíneo irregular, permeabilidade vascular aumentada e pressão elevada no espaço intersticial intra-tumoral. Estas modificações facilitam a entrada de células neoplásicas em circulação e a metastização e dificultam a acção de alguns fármacos anti-tumorais<sup>17,18,19</sup>.

As células endoteliais das neoplasias expressam com elevada frequência algumas moléculas de superfície, nomeadamente integrinas, E-selectina, endogлина, endosialina e receptores do VEGF que podem ser alvo de terapêuticas biológicas dirigidas<sup>20</sup>.

*“onset of angiogenesis also contributes to metastasis... decreased angiogenesis is associated with a decreased rate of metastasis”.*

Folkman

Há evidência pré-clínica e clínica do papel importante da angiogénese no desenvolvimento tumoral e na progressão neoplásica<sup>21</sup>. Folkman demonstrou a importância da angiogénese na progressão neoplásica: “para um tumor crescer mais do que 1-2mm necessita de vasos sanguíneos para o fornecimento de nutrientes e oxigénio”<sup>22</sup>. Estudos recentes têm demonstrado uma correlação entre o grau de angiogénese tumoral e o prognóstico (mama; prostata; cólon; pulmão e cérebro) tendo a angiogénese sido proposta como um marcador prognóstico promissor em neoplasias de vários órgãos<sup>23,24</sup>. Poucos estudos têm avaliado a implicação clínica da angiogénese tumoral nos GEP-NETs, sendo os resultados controversos.

A inibição da angiogénese associa-se a diminuição do crescimento e da metastização tumoral em muitos modelos pré-clínicos. Há ensaios clínicos de fármacos anti-angiogénicos em carcinomas metastizados com resultados interessantes<sup>25</sup>.

Investigações recentes sugerem que a terapêutica anti-angiogénica pode, além de inibir a angiogénese, modelar a estrutura e função dos neovasos, aumentando a acessibilidade de fármacos e normalizando o micro-ambiente tumoral<sup>26</sup>. Contrariamente às células endoteliais de tecidos normais, que em condições fisiológicas são quiescentes - excepto durante períodos de inflamação, ovulação, gravidez, cicatrização de feridas e de isquemia -, as células endoteliais nas neoplasias em progressão apresentam índice mitótico até 50 vezes superior e maior sensibilidade à terapêutica anti-angiogénica. Por outro lado, as células endoteliais neoplásicas parecem ser geneticamente estáveis e desenvolvem menos resistência à terapêutica<sup>19,27</sup>. Quando indicada, alguns autores sugerem a importância da terapêutica anti-angiogénica precoce, de modo a inibir as fases iniciais do crescimento neoplásico ou a diminuir o crescimento de neoplasias mais avançadas, sendo a eficácia inversamente proporcional ao volume tumoral.

Vários ensaios clínicos estão a decorrer com inibidores da angiogénese em GEP-NETs com resultados controversos<sup>8,28,29,30</sup>. Muitos investigadores têm sugerido que os inibidores da angiogénese são citostáticos e não citotóxicos. O facto de uma grande percentagem de tumores neuroendócrinos apresentar uma evolução lenta torna difícil a interpretação destes resultados.

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

Um dos métodos de avaliação da angiogénese consiste na determinação da densidade vascular. A principal limitação na avaliação da angiogénese através da determinação da densidade vascular decorre do tipo de marcador utilizado. De facto, não existe consenso na literatura relativamente ao anticorpo mais adequado. Múltiplos estudos têm utilizado marcadores pan-endoteliais, nomeadamente CD34, CD31 e factor de von Willebrand, na avaliação da densidade de microvasos. A avaliação da densidade de microvasos com estes marcadores pode não ser a mais correcta porque eles também são expressos em vasos normais<sup>31,32</sup>.

A glicoproteína transmembranar CD31 (molécula de adesão celular plaqueta-endotélio) é um marcador pan-endotelial sensível em tecidos tumorais e normais. Também pode ser expressa em células plasmocitárias e inflamatórias<sup>33,34</sup>. No entanto, a expressão de CD 31 pode não ser detectada em neovasos intra-tumorais, como descrito por Giatromanolaki *et al*<sup>34</sup>.

Vários estudos têm evidenciado que nenhum dos marcadores vasculares, nomeadamente o factor de von Willebrand, o CD 31 ou o CD 34, é ideal para a avaliação da angiogénese neoplásica porque não permitem identificar neovasos nem são específicos de células endoteliais<sup>32,35</sup>.

O anticorpo monoclonal CD 105 (endoglina), identifica o receptor do factor transformador do crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Este receptor é uma glicoproteína transmembranar do tipo I que é expressa nas células endoteliais na angiogénese tumoral e nos processos inflamatórios, sendo pouco expressa no endotélio de tecidos normais<sup>36</sup>. Múltiplos estudos têm demonstrado que a endoglina é um marcador mais específico e sensível da angiogénese quando comparado com outros anticorpos endoteliais<sup>37,38,39,40,41,42</sup>.

Há evidências que sugerem que a endoglina é um alvo terapêutico potencial em neoplasias malignas sólidas. Estudos recentes indicam que imunoterapia passiva com anti-

corpos monoclonais anti-endoglina podem diminuir o crescimento tumoral e vacinas de DNA xenogénicas homólogas podem inibir imunidade anti-tumoral cruzada<sup>43,44</sup>. Não existem estudos publicados sobre o papel da endoglina, como marcador da densidade microvascular, como factor prognóstico ou biomarcador terapêutico nos GEP-NETs.

## OBJECTIVOS

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

## MATERIAL E MÉTODOS

### SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CASOS

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

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

Foram identificados 145 casos, desde Janeiro de 1978 até Dezembro de 2006, com GEP-NETs submetidos a cirurgia de ressecção e/ou biópsia incisional ou excisional. Foram excluídos os tumores neuroendócrinos de outras localizações, bem como os casos sem

material anátomo-patológico disponível - de produtos de ressecção ou de biópsia (25 casos). Foram revistos cortes corados com Hematoxilina-Eosina e avaliada a expressão de cromogranina A, sinaptofisina e NSE.

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

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

### AValiação Patológica

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

Para a avaliação das amostras dos 39 casos seleccionados foi efectuado um "tissue microarray" (TMA). As áreas representativas dos tumores foram seleccionadas a partir das lâminas de Hematoxilina-Eosina. As amostras (2-3 amostras/caso) seleccionadas dos blocos originais foram depois depositadas no bloco TMA.

### ANTICORPOS

Ver Quadro I.

QUADRO I: Marcadores utilizados no estudo e origem destes

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

### IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação da expressão de endoglina

e CD31 foi efectuada em cortes de 2µm colocados em lâminas adesivadas e secos na estufa a 60°C durante 1 hora. As lâminas foram deparafinizadas em SUB-X Clearing Agent (Surgipath™)<sup>®</sup> e hidratadas até à água corrente com etanol.

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

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

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

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

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

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

## QUANTIFICAÇÃO

O procedimento de contagem foi efectuado sem conhecimento do estado clínico-patológico nem do anticorpo utilizado em cada caso. As lâminas foram revistas aleatoriamente, de modo a evitar associação de resultados. Após avaliação de cada caso a baixa ampliação (x40), foram seleccionadas por 2 observadores três áreas da neoplasia com

maior número de microvasos (“hot spots”). Posteriormente, os dois observadores, independentemente, avaliaram os casos, efectuando contagens de microvasos em campos de grande ampliação (x400 - 0.15mm<sup>2</sup>). Foram efectuadas 1 a 3 contagens por caso, dependendo da dimensão do *hotspot*. Cada célula ou *spot*, identificada pelo marcador imunohistoquímico, foi considerada positiva, independentemente da presença de lúmen vascular<sup>45</sup>. O maior número de vasos contados por caso foi utilizado na análise estatística. Foi avaliado o valor de K entre os dois observadores. Os casos discordantes (> 10% na contagem de microvasos) foram reavaliados para estabelecer consenso final.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

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

## RESULTADOS

### CASUÍSTICA

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

dos, diagnosticados de 1978 – 2006 (*comunicação, publicada em abstract, no Livro de Resumos da reunião internacional - 4th Annual ENETS Conference – Barcelona, Espanha – 15-17 de Março de 2007*), com a idade mediana de 52 anos no momento do diagnóstico (extremos etários: 8 – 87 anos de idade); 49,6% dos doentes eram do sexo masculino e 50,4% do sexo feminino. A relação sexo M/F foi de 0,98; 10,3% das neoplasias apresentavam-se com síndromes endócrinas de hiperfunção. A frequência relativa por órgão foi: estômago (11%); duodeno (11,7%); pâncreas (25,6%); intestino delgado (11,7%); apêndice ileocecal (31,8%); cólon (2,6%) e recto (4,8%); 73,8% dos doentes apresentavam doença local, 15,2% doença locorregional e 9% metástases à distância. A taxa de sobrevida aos 5 anos dos pacientes da nossa série com metástases hepáticas (40,5%), foi significativamente ( $p = 0.007$ ) inferior à da dos pacientes sem metástases hepáticas (85,8%) (*comunicação, publicada na forma de abstract, no Livro de Resumos da reunião internacional - 5th Annual ENETS Conference – Paris, França – 6-8 de Março de 2008*).

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

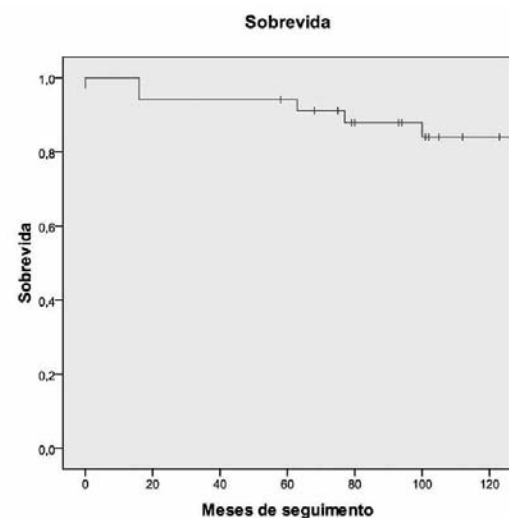
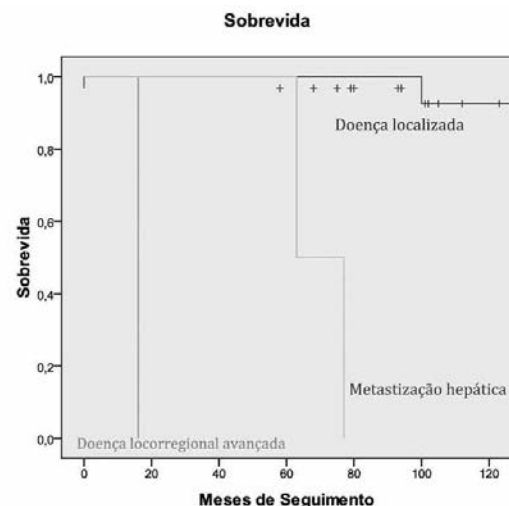


GRÁFICO II: Curvas de sobrevida dos doentes com GEP-NETS: com doença localizada, com metastização ganglionar e com metastização à distância





### CD105

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

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

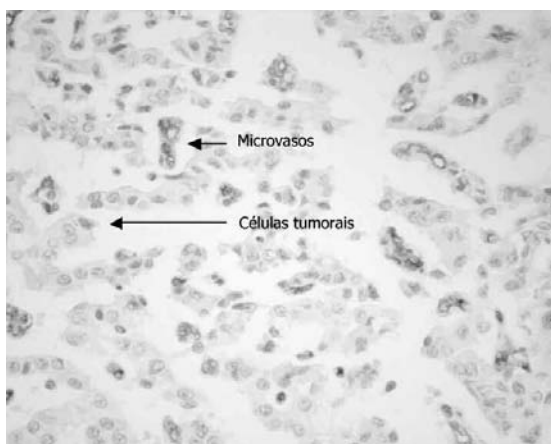
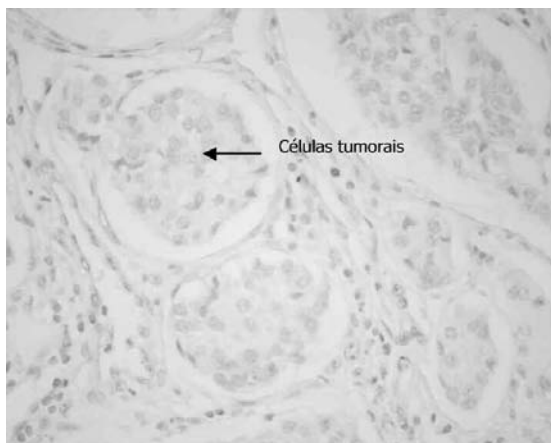


FIGURA 2: Ausência de expressão de CD105 num tumor neuroendócrino (x400 - 0.15mm2).

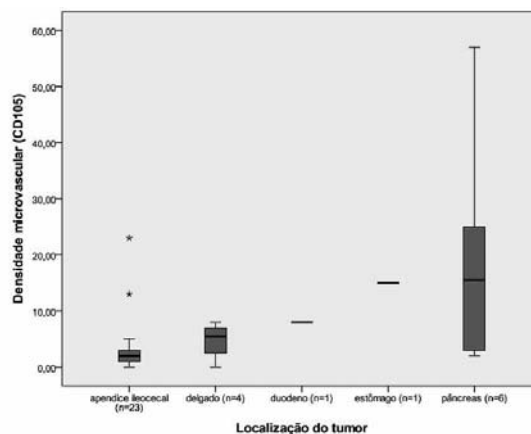


A expressão de CD105 foi observada em tumores com doença locorregional avançada, com metastização à distância e com estadiamento clínico-patológico menos avançado (T1N0M0).

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

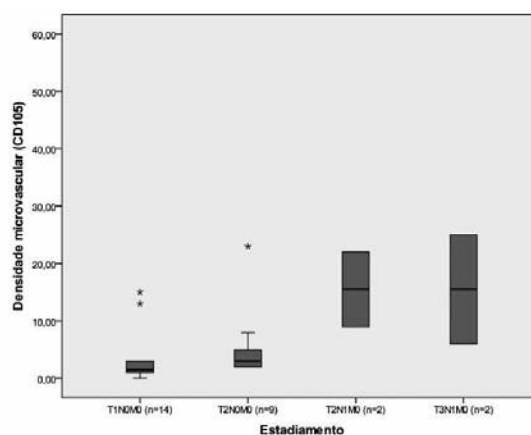
Como se pode verificar pelo Gráfico III, a expressão de CD105 relacionou-se com o órgão envolvido ( $p=0,03$ ), sendo os tumores do apêndice ileocecal os com menor densidade microvascular e os tumores endócrinos do pâncreas os com maior densidade microvascular.

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



Foram também verificadas diferenças com significado estatístico na densidade de microvasos relativamente ao estadiamento do tumor ( $p=0,024$ ; Gráfico IV). Foram excluídos desta análise os tumores TxNOM0 (7 casos).

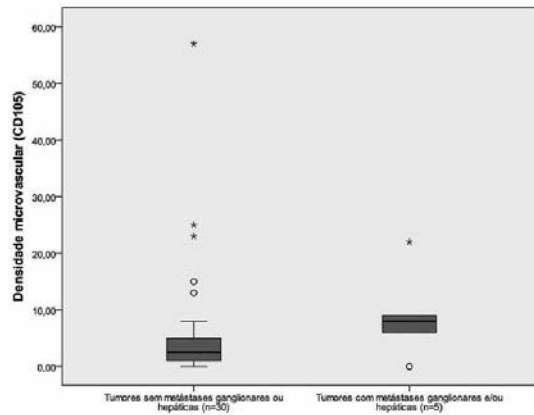
GRÁFICO IV: Densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, do TNE, em função do estadiamento do tumor.



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

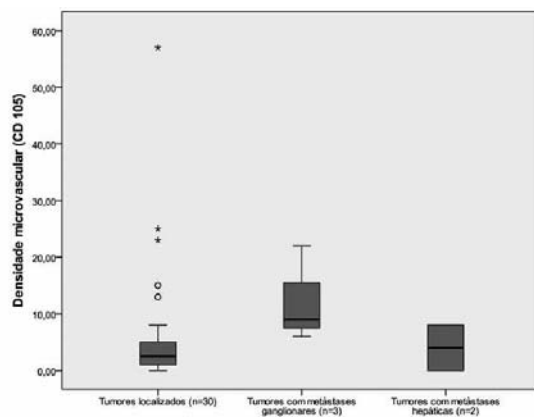
não metastizados, mas sem significado estatístico ( $p=0,087$ ; Gráfico V).

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



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

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



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

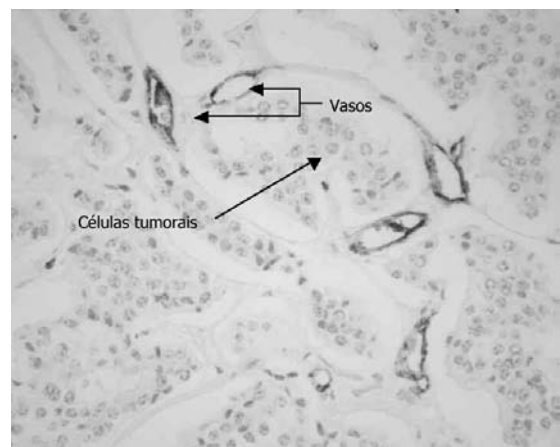
Não foram verificadas diferenças com significado estatístico na densidade microvascular, determinado pela expressão de

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

### CD31

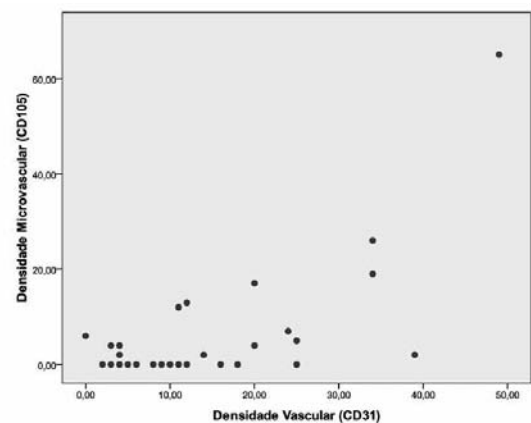
Foram observados vasos com expressão de CD31 nos tecidos neoplásicos (Figura 3) e não neoplásicos. A mediana da densidade vascular dos TNEs desta série, determinada pela expressão de CD31, foi de 13,0 /cga.

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



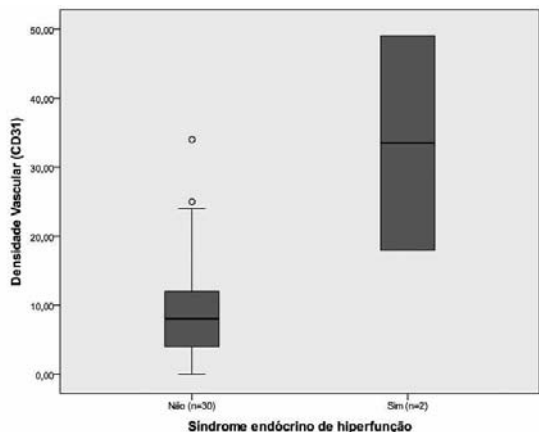
Foi verificada correlação significativa ( $p = 0,01$ ; coeficiente de correlação de Pearson = 0,721) entre a densidade microvascular determinada pela expressão de CD105 e a densidade vascular determinada pelo CD31 – Gráfico VII.

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



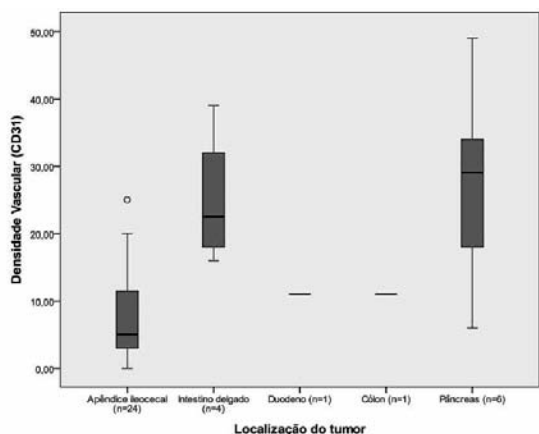
Dois tumores endócrinos pancreáticos associados a síndromes endócrinas de hiperfunção (insulinoma e glucagonoma) apresentavam maior número de vasos com expressão de CD31, embora sem significado estatístico, do que os tumores sem síndromes de hiperfunção ( $p=0,053$ ; Gráfico VIII).

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



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

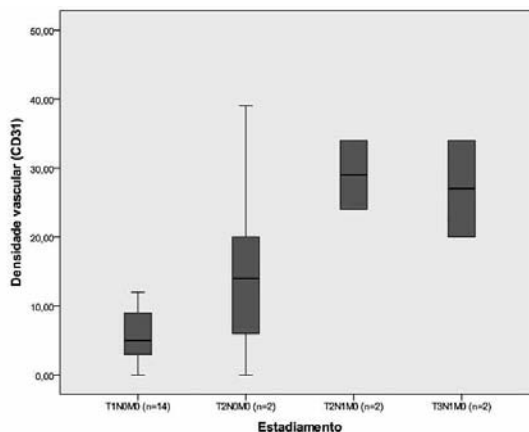
GRÁFICO IX: Densidade vascular do TNE, determinada pela expressão de CD31, em função do órgão envolvido pelo tumor.



Verificou-se um aumento da densidade vascular com o estágio da neoplasia, ou seja, os tumores com estágio (proposta ENETS de estadiamento TNM<sup>4,5</sup>) superior apresentavam maior número de vasos rela-

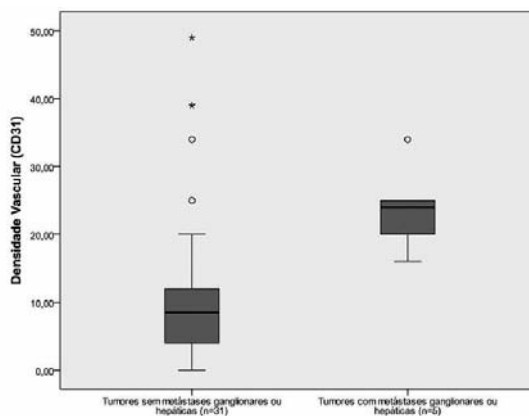
tivamente a tumores com estágio inferior ( $p=0,014$ ; Gráfico X). Foram excluídos da análise estatística os tumores TxNOM0.

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



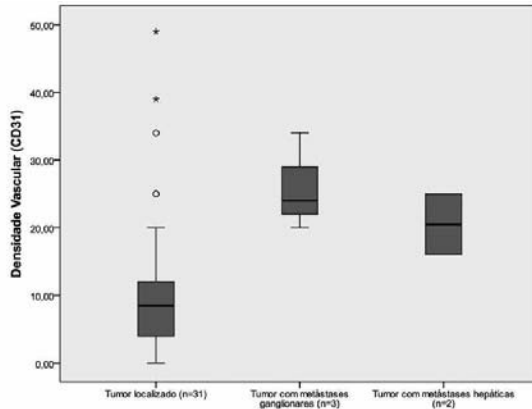
Verificou-se que os tumores com metástase ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade vascular do que os tumores sem metástases ( $p=0,01$ ; Gráfico XI).

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



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

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



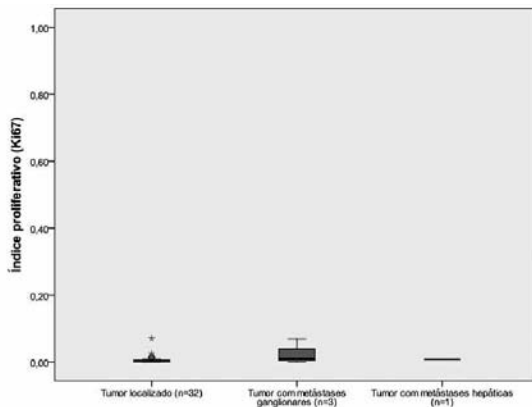
A avaliação da sobrevivência dos doentes, tendo em consideração a densidade vascular determinada pela expressão de CD31, revelou diferenças significativas ( $p < 0,005$  - análise univariada). Não foi efectuada análise multivariada devido ao pequeno número de casos.

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

### Ki-67

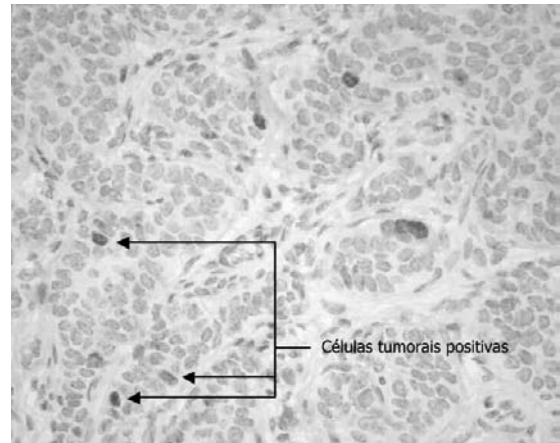
Como se pode verificar pelo Gráfico XIII, todos os tumores apresentavam um baixo índice proliferativo, incluindo os com metastização ganglionar e à distância (valor médio  $< 1\%$ ; mediana  $< 1\%$ ; varia-

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



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

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



Não foram verificadas diferenças com significado estatístico no índice proliferativo, determinado pelo Ki-67, relativamente ao sexo, à idade, à funcionalidade do tumor, ao órgão envolvido nem ao estadiamento do tumor. Não foi verificada relação estatisticamente significativa entre o índice proliferativo determinado pelo Ki-67 e a densidade microvascular / vascular, determinadas respectivamente pela expressão de CD105 e CD31.

## TUMORES ENDÓCRINOS DO PÂNCREAS

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

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

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

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

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

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

### TUMORES NEURO-ENDÓCRINOS DO INTESTINO MÉDIO (EXCLUINDO APÊNDICE ILEOCECAL)

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

Três dos 4 doentes com tumores neuroendócrinos do delgado apresentavam doença avançada (1 doente com doença locorregional avançada – T3N1M0; 2 doentes com metastização à distância).

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

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

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

### TUMORES NEURO-ENDÓCRINOS DO APÊNDICE ILEOCECAL

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

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

Todos os doentes apresentavam doença localizada: T1N0M0 ou T2N0M0.

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

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

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

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

## DISCUSSÃO

Os GEP-NETs são tumores raros constituindo aproximadamente 2 % das neoplasias do sistema gastro-intestinal<sup>1</sup>.

A ENETS desenvolveu uma proposta de estadiamento TNM para os GEP-NETs que ainda se encontra em validação para a aplicação à clínica e em ensaios de doentes com GEP-NETs<sup>3,4</sup>. No entanto, uma vez que grande parte dos dados apresentados na literatura, incluindo os do nosso grupo (*estudo publicado em abstract, no Livro de Resumos da reunião*

internacional - 5th Annual ENETS Conference – Paris, França – 6-8 de Março de 2008), demonstram a importância prognóstica do novo sistema de classificação TNM da ENETs em pacientes com GEP-NETs, decidiu-se utilizá-lo no presente trabalho.

Os GEP-NETs são tumores habitualmente indolentes, no entanto, alguns são indiferenciados e biologicamente mais agressivos. Em 73,8% dos doentes da nossa casuística a doença apresentava-se localizada, em 15,2% com extensão locorregional e em 9% com metástases à distância. A frequência de metastização à distância nesta série de GEP-NETs (9%) foi inferior à relatada em séries maiores (25-90%)<sup>1,46</sup>.

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

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

A sobrevivência aos 5 anos, referida na literatura, dos GEP-NETs bem diferenciados é de 78-93% para os tumores localizados, 72-74% para os tumores loco-regionais e 19-38% para os tumores metastizados<sup>46</sup>. Para a análise da sobrevida global e sobrevida livre de doença é essencial um seguimento rigoroso dos doentes e períodos de *follow-up* longos. O tempo de seguimento médio na nossa série foi de 140,8 meses, mediana de 117,5 meses (extremos: 0 – 273 meses); 5/39 doentes (12,5 %) faleceram; 5 doentes (12,5 %) foram perdidos para *follow-up*; aos 10 anos de *follow-up*, mais de 80% dos doentes encontravam-se vivos.

Globalmente os resultados de sobrevida da nossa série, confirmam que se trata de

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

Apesar dos avanços no conhecimento biológico destes tumores, as taxas de sobrevivência têm-se mantido estáveis nas últimas 5 décadas<sup>46</sup>. Actualmente, a panóplia de tratamentos inclui: cirurgia, terapêutica biológica com análogos da somatostatina e/ou interferão alfa, terapêuticas ablativas das metástases hepáticas, análogos da somatostatina associados a radioisótopos e a quimioterapia<sup>2,8,47</sup>. Muitos estudos têm demonstrado que a inibição da angiogénese se associa a diminuição do crescimento e da metastização numa variedade de neoplasias, no entanto, o papel dos inibidores da angiogénese nos GEP-NETs continua por esclarecer.

Para além da importância da angiogénese na determinação do prognóstico e da sua aplicabilidade terapêutica, a avaliação não invasiva da microvascularização tumoral, por tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear ou tomografia por emissão de positrões, usando marcadores específicos, como marcadores de moléculas de superfície do endotélio (integrinas, endoglin, VEGF) poderá ter, no futuro, um papel importante no diagnóstico, nomeadamente de recidivas, e na monitorização da resposta à terapêutica das neoplasias<sup>48,49</sup>.

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

Um dos métodos de avaliação da angiogénese consiste na determinação da densidade vascular. A principal limitação na avaliação da angiogénese através da determinação da densidade vascular decorre do tipo de marcador utilizado<sup>32,33,34,35</sup>. De modo a avaliar a relação entre a angiogénese, o

prognóstico e estadiamento, utilizou-se um marcador pan-endotelial, o CD31, e o anti-corpo monoclonal CD105 (endogлина) que é um marcador com especificidade tecidual acentuada, preferencialmente expresso nas células endoteliais dos tecidos em processo de angiogénese activa. De facto, este estudo constitui um trabalho original utilizando o CD105 como marcador para a avaliação da angiogénese em GEP-NETs. Para além da avaliação tecidual da endogлина é possível a sua determinação plasmática, que não foi determinada neste estudo retrospectivo. Níveis plasmáticos aumentados de endogлина têm sido descritos em doentes com carcinomas colorectais ou da mama metastizados. Os resultados têm sugerido que os níveis plasmáticos de endogлина podem ser utilizados na identificação precoce de metástases e na avaliação da resposta à terapêutica anti-angiogénica<sup>50,51</sup>.

No nosso estudo, e de acordo com o descrito na literatura<sup>38,39,40,42</sup> não detectamos microvasos com expressão de CD105 nos tecidos não neoplásicos.

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

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

Adicionalmente verificou-se que os tumores com metastização ganglionar e/ou à distância apresentavam maior densidade microvascular, mas sem atingir o nível de

significância, quando comparados com TNEs não metastizados.

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

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

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

Os resultados da avaliação da angiogénese nesta série permitem admitir que há possivelmente incorporação de vasos do hospedeiro e indução de neovasos na patogénese dos GEP-NETs. O esclarecimento mais adequado desta redundância de mecanismos angiogénicos pode ajudar a explicar a controvérsia dos resultados terapêuticos descritos, designadamente em ensaios clínicos com anti-angiogénicos em GEP-NETs.

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

Com base nos nossos resultados é provável que os doentes com GEP-NETs de alguns

órgãos, com estádios avançados, sejam candidatos para terapêutica anti-angiogénica.

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

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

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

## CONCLUSÕES

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

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

No nosso estudo, e de acordo com o descrito na literatura<sup>38,39,40,42</sup> não detectamos microvasos com expressão de CD105 nos tecidos não neoplásicos.

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

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

A densidade vascular, determinada pela expressão de CD31, tal como a densidade microvascular, determinada pela expressão de CD105, dos tumores da nossa série associou-se significativamente ao estádio dos tumores e à sobrevida dos doentes com GEP-NETs.

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

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



## BIBLIOGRAFIA

1. Tomassetti P, Migliori M, Lalli S, et al.: Epidemiology, clinical features and diagnosis of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Ann Oncol* 12 (suppl.2): S95-S99, 2001.;
2. Ramage J. K., et al; Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumors; *Gut* 2005; 54; 1-16.;
3. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006 Oct;449(4):395-401.;
4. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007 Oct;451(4):757-62.;
5. Starker LF, Carling T.; Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.; *Curr Opin Oncol.* 2009 Jan;21(1):29-33.;
6. Öberg K.; Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.); *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 Feb;16(1):72-8.;
7. Goran Akerstrom; Per Hellman.; Surgery on neuroendocrine tumours.; *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 21, No. 1, pp. 87–109, 2007).;
8. K. Öberg et al; Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.; *Annals of Oncology* 21: v223–v227, 2010.;
9. Wulbrand U, Feldman M, Pfestroff A et al.: A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes. *Cancer* 2002 Feb 15;94 (4Suppl.):1293-7.;
10. Hofland LJ, Lamberts SWJ: Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 12 (Suppl.2): S31-S36, 2001.;
11. Kulaksiz H, Eissele R, Rossler D et al.: Identification of somatostatin receptor subtypes 1,2A,3 and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut* 2002 Jan;50(1):52-60.;
12. Folkman J et al. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Câncer Biol* 1992 3:65-71.;
13. Arbiser JL, et al.; Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:861-866.;
14. Okada F, et al.; Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 3609-3614.;
15. Dameron KM, et al.; The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994, 59:483-489.;
16. Rodriguez-Manzaneque JC, et al.; Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:12485-12490.;
17. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029-1039.;
18. Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.;
19. Dass CR, Su T (2000). Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: role of vascular endothelial cells. *J Pharm Pharmacol* 52:1301-1317.;
20. William J. Larochelle, Richard A. Shimkets.; *Oncogenomics handbook.*;
21. Heinz-Josef Lenz et al; Antiangiogenic agents in cancer therapy; *Oncology (Williston Park).* 2005 Apr;19:17-25.;
22. J Folkman et al.; *N Engl J Med*, 1971; 285: 1182-6.;
23. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, et al. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg.* 1980; 192: 762 – 771.;
24. Sillman F, Buyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 139: 154 – 159.;
25. Jonathan Whisenant, Emily Bergsland.; Antiangiogenic strategies in gastrointestinal malignancies; *Curr Treat Options Oncol.* 2005 ep;6:411-21.;

26. Rakesh K Jain.; Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts; *Oncology (Williston Park)*. 2005 Apr ;19:7-16.;
27. Fayette J, Soria JC, Armand JP (2005). Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 41:1109-1116.;
28. Matthew H. Kulke et al.; Phase II Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors.; *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24, No 22 (August 1), 2006: pp. 3555-3561.;
29. Matthew H. Kulke et al.; Activity of Sunitinib in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors.; *J Clin Oncol* 2008 26:3403-3410.;
30. Jaume Capdevila.; Ramon Salazar.; Molecular targeted therapies in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.; *Targ Oncol* (2009) 4:287-296.;
31. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:386-388.;
32. Fanelli M, Locopo N, Gattuso D, e tal. Assessment of tumor vascularization imunohistochemical and non-invasive methods. *Int J Biol Markers*. 1999; 14:218-231.;
33. Mietinnen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, BNH9 antibody to H- and Y- antigens: evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol* 1994;7:82-90.;
34. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, e tal. Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinoma ? *Oncol Res*. 1999; 11: 205-212.;
35. Haggstrom S, Bergh A, Damber JE. Vascular endothelial growth factor content in metastasizing and nonmetastasizing Dunning prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2000;45:42-50.;
36. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C.; CD105 and angiogenesis. *J Pathol*. 1996; 178: 363-366.;
37. Kumar S, Ghellal A, Li C, e tal. Breast carcinoma: vascular density determined using CD 105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999;178:363-366.;
38. Saad RS, Jasnosz KM, Silverman JF. Endoglin (CD 105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2003; 22: 248-253.;
39. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, e tal. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical câncer. *Obstet Gynecol*. 2000;96:224-228.;
40. Saad RS, Liu YL, Nathan G, e tal. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorrectal câncer development. *Mod Pathol*. 2004; 17: 197-203.;
41. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, e tal. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the processo f colorrectal câncer development. *Surgery*. 20002; 131 (1 suppl): S109-S113.;
42. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, e tal. Overexpression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-indeuced neovascularization. *Anticancer Res*. 1998; 18:3621-3628.;
43. J-G Jiao et al.; A plasmid DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces anti-tumour immune response against self-endoglin-related angiogenesis in two liver cancer models; *Dig Liver Dis*. 2006 Jun 12.;
44. Jie-Ge Jiao e tal.; A DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces antitumor immunity in a mouse colon carcinoma model; 2005 Oct ;24:1179-83.;
45. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, e tal. Quantification of angiogenesis insolid human tumors: na international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996; 32: 2474-2484.;
46. Modlin et al. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97:934-959. 2003.;
47. Günter Klöppela et al.; ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Towards a Standardized Approach to the Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Their Prognostic Stratification.; *Neuroendocrinology* 2009;90:162-166.;
48. Baris Turkbey, Hisataka Kobayashi, Mikako Ogawa, Marcelino Bernardo and Peter L. Choyke.; *Imaging of Tumor Angiogenesis: Functional or Targeted?* *AJR* 2009; 193:304-313.;
49. Josephs D, Spicer J, O'Doherty M.; *Molecular imaging in clinical trials.*; *Target Oncol*. 2009 Sep;4(3):151-68. Epub 2009 Sep 21.;
50. Sarah E. Duff et al.; CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications.; *FASEB Journal*. 2003;17:984-992.;
51. Nikolaos A. Dallas, Shaija Samuel, Ling Xia, Fan Fan, Michael J. Gray, SherryJ. Lim, and LeeM. Ellis.; *Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy.*; *Clinical Cancer Research* April 2008 14; 1931.

# O valor do cortisol salivar em Endocrinologia Clínica

## *The Value of Salivary Cortisol in Clinical Endocrinology*

RJ Santos<sup>1</sup>, S Prazeres<sup>1</sup>, AC Martins<sup>1</sup>, LG Sobrinho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Endocrinologia, Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Lisboa

**Correspondência:** Rita J Santos · Serviço de Endocrinologia · Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil · Rua Professor Lima Bastos · 1099-023 LISBOA · Portugal · ritajsantos@hotmail.com

**Aceitação:** Artigo recebido em 20/08/2010, revisto em 14/12/2010 e aceite para publicação em 14/12/2010.

### RESUMO

**Introdução:** É hoje reconhecido que as concentrações de cortisol salivar podem ser úteis na avaliação da função do córtex da supra renal. O Laboratório de Endocrinologia do IPO de Lisboa tem utilizado um método de medição do cortisol salivar como rotina no Serviço.

**Objectivos:** Obtenção dos valores de referência numa população normal e em populações de doentes seleccionados. Comparar os valores do cortisol salivar com os do cortisol urinário das 24h na avaliação das disfunções da supra renal.

**Material e Métodos:** Foram colhidas 247 amostras de saliva de voluntários saudáveis para obtenção dos intervalos de referência.

Foram seleccionados e agrupados em quatro categorias 116 processos da consulta de Endocrinologia com doseamentos de cortisol salivar e urinário: hiperfunções do córtex supra renal; doença de Addison; adenomas não funcionantes da supra renal; patologia variada.

**Resultados:** O intervalo de referência para o cortisol salivar da manhã foi: 2.6– 60.7 nmol/L e da noite: 1.0–14.9 nmol/L. Não houve diferenças significativas entre faixa etária, homens e mulheres. Nas hiperfunções do córtex da supra renal o cortisol salivar das 23 h teve uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 87%. Para o cortisol das 9 h os mesmos valores foram de 16% e 78%, respectivamente. Houve correlação positiva significativa ( $R=0,6$ ) entre o cortisol salivar das 23h e o cortisol urinário. Em 26 “incidentalomas” da supra renal o cortisol salivar das 23h foi normal em todos enquanto o cortisol urinário foi elevado em oito.

**Discussão/Conclusões:** Os intervalos de referência determinados foram superiores aos de outros autores. O método e modo de colheita variam, sendo essencial que cada laboratório defina os seus valores. As razões da dissociação entre cortisol salivar e urinário nos incidentalomas serão discutidas.

A nossa série confirma que o cortisol salivar das 23h é um excelente método na caracterização de hiperfunções da supra renal.

### PALAVRAS-CHAVE

Cortisol salivar; Cortisol urinário; Córtex supra renal; Hipercortisolismo; Adenoma da supra renal.

### ABSTRACT

**Introduction:** *The measurement of salivary cortisol is a valuable tool in the assessment of the adrenal cortex function. In the present report we review the basic principles involved and describe our experience with a radioimmunoassay method to measure salivary cortisol.*

**Objectives:** *To define the reference values in the normal population and find out the diagnostic*

*validity of salivary cortisol in selected groups of patients.*

*Material and methods: Morning and late evening saliva samples were collected from 127 healthy volunteers. Salivary and urinary cortisol measurements were obtained in 51 patients with adrenal disorders and in 60 with miscellaneous, non-adrenal, conditions.*

*Results: The reference intervals for salivary cortisol were: Morning = 2.6 - 60.7 nmol/L; Late evening = 1.0 - 14.9 nmol/L. There were no significant differences between men and women or between age groups.*

*In adrenal hyperfunction evening salivary cortisol had a sensitivity of 83% and a specificity of 87%. There was a significant positive correlation ( $R = 0.6$ ) between evening salivary cortisol and urinary cortisol. In 26 adrenal "incidentalomas" the evening salivary cortisol was elevated in two while urinary cortisol was elevated in eight.*

*Discussion / Conclusions: The reference intervals for salivary cortisol were higher than those referred by other authors. It is, therefore, essential that each laboratory defines its values. Our series confirms that the evening salivary cortisol is an excellent method in the screening for adrenal hyperfunction. The possible reasons for the dissociation between salivary and urinary cortisol in incidentalomas are discussed.*

#### KEYWORDS

*Salivary cortisol; Urinary cortisol; Adrenal cortex; Hypercortisolism; Adrenal adenoma.*

## INTRODUÇÃO

A avaliação da actividade do córtex da supra renal e da exposição dos tecidos à acção do cortisol tem sido avaliada através dos doseamentos do cortisol no soro e/ou na urina das 24 horas.

Cada um destes métodos tem vantagens e inconvenientes conhecidos:

1 – O doseamento do cortisol sérico é muito pouco sujeito a interferência por outras substâncias circulantes – naturais ou fármacos – e permite o recurso a medições repetidas durante provas dinâmicas. No entanto, cerca de 80 % do cortisol sérico circula ligado a uma proteína de transporte – CBG (Cortisol - Binding Globulin), 15% circula ligado à albumina e só cerca de 5% circula "livre". Estas percentagens variam com as concentrações totais de cortisol sérico já que a CBG tem muito alta afinidade para o cortisol mas circula em concentrações baixas e satura quando este atinge concen-

trações de 25 µg/dl. A partir desta concentração o cortisol sérico distribui-se apenas pela fracção ligada à albumina (para a qual tem muito menos afinidade) e pela fracção "livre", de modo que esta última aumenta desproporcionadamente para grandes concentrações de cortisol sérico<sup>1</sup>.

2 – O cortisol urinário espelha as concentrações de cortisol "livre" no soro (o único que é filtrado) nas 24 horas. Não depende das flutuações pontuais devidas à secreção pulsátil do cortisol nem das concentrações da CBG que variam de pessoa para pessoa e aumentam com a gravidez e exposição a estrogénios orais<sup>2</sup>. Por outro lado o rigor dos resultados depende de uma correcta colheita da urina de 24 horas, sempre problemática. Além de que a urina contém esteróides endógenos ou exógenos, por vezes em quantidades muito elevadas, que afectam os resultados das medições, mesmo quando a reacção

cruzada destes esteroides com o cortisol, em condições de equimolaridade, é baixa<sup>2</sup>.

A imensa maioria da vasta literatura sobre diagnóstico das hiper ou hipofunções do córtex supra-renal foi construída com base nestes dois tipos de medições.

O reconhecimento de que a saliva contém cortisol e que as concentrações de cortisol salivar permitem estimar as concentrações de cortisol "livre" no soro levou a que, ultimamente, vários centros tenham utilizado esta variável na avaliação da função do córtex supra-renal para efeitos de diagnóstico ou de estudos de fisiologia e fisiopatologia.

Com efeito o doseamento do cortisol salivar tem vantagens únicas:

- 1 – Fácil execução, não invasivo e "stress-free".
- 2 – Permite que as colheitas sejam feitas em casa, a qualquer hora. O cortisol é estável à temperatura ambiente pelo que o doente pode fazer as colheitas em casa e levá-las ao laboratório no dia seguinte ou até mandá-las pelo correio<sup>3</sup>. Isto é sobretudo relevante quando se pretende a avaliação das concentrações do cortisol pelas 23 horas, quando as concentrações fisiológicas são mínimas e a diferença entre normalidade e hiperfunção é máxima.
- 3 – As concentrações do cortisol na saliva não variam com as variações do fluxo salivar<sup>2</sup>.

No entanto, o valor diagnóstico do cortisol salivar é afectado pelo facto das glândulas salivares exprimirem a enzima desidrogenase dos 11 hidroxisteroides, tipo 2, (11 HSD, 2) que converte o cortisol em cortisona pelo que as concentrações de cortisol na saliva são cerca de 50% da concentração "livre" no soro<sup>4,5,6</sup>. Para mais, a variabilidade do rendimento da conversão do cortisol em cortisona é grande, tendo o quociente entre cortisol e cortisona na saliva variado entre 7% e 47% numa série de 12 pessoas normais<sup>7</sup>. Como os métodos de medição do cortisol salivar correntes

em medicina clínica não medem a cortisona, a presunção de que o cortisol salivar "mede" o cortisol "livre" no soro está sujeita a um erro grande e não quantificável. A ultrapassagem desta limitação através da medição simultânea de ambos os esteróides requiere metodologia muito laboriosa, não acessível a laboratórios de apoio à clínica.

Num dos poucos trabalhos publicados em que o cortisol e a cortisona salivar foram medidos simultaneamente verificou-se que as concentrações médias de cortisol salivar de manhã (9,3 nmol/l) são cerca de metade das concentrações de cortisona (17,9 nmol/l) enquanto no sangue as concentrações de cortisol são de 344 nmol/l e as de cortisona de 51 nmol/l<sup>5</sup>. Dois factores justificam esta desproporção. Um, como já vimos é a conversão de cortisol em cortisona. O outro é a reduzida afinidade da CBG para a cortisona pelo que as concentrações da fracção "livre" desta no soro, que é a que passa para a saliva, são cerca de 10 vezes superiores às do cortisol<sup>4</sup>.

O Laboratório de Endocrinologia do IPO tem usado desde 1998, um método de medição do cortisol salivar que tem sido usado como rotina no Serviço.

O presente trabalho descreve as características do método usado, define os valores de referência numa população normal, de manhã e à noite, e em populações de doentes seleccionados. São também comparados os valores do cortisol salivar com os do cortisol urinário das 24 horas na avaliação das disfunções da supra-renal.

## MÉTODOS

Doseamento do cortisol urinário: O cortisol urinário foi doseado por radioimunoensaio (Cortisol – Coat-A-Count, Siemens, Los Angeles, USA). A sensibilidade do ensaio é de 5.52 nmol/L. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio, para uma concentração de 552 nmol/L 20, é de 3.0 e 4.0%, respectivamente.

Doseamento do cortisol salivar: O doseamento do cortisol salivar foi efectuado por radioimunoensaio (CORT-CT2, CIS bio international, Gif-sur-Yvette, France), adaptado para medições em saliva, de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez que a concentração de cortisol na saliva é muito inferior à existente no soro e na urina, o método não pode ser usado directamente, sendo necessário a preparação de uma curva de calibração entre 1 e 100 nmol/L.

A sensibilidade do ensaio é de 0.8 nmol/L. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio, para uma concentração de 65 nmol/L, é de 4.5 e 5.5%, respectivamente.

Por razões práticas, valores inferiores ao primeiro ponto da curva de calibração foram considerados como 1 nmol/L.

Doseamento de ACTH: A ACTH foi doseada por um método quimioluminescente do tipo sandwich (ACTH-Immulite 2000, Siemens, Los Angeles, USA). A sensibilidade do ensaio é de 5 pg/mL. O coeficiente de variação intra e inter ensaio para uma concentração de 42 pg/mL é respectivamente 6.8 e 8.2%. O intervalo de referência é <46 pg/mL.

#### DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA O CORTISOL SALIVAR

Amostras de saliva: 247 amostras de saliva foram colhidas por voluntários saudáveis (44 homens, 34±18 anos, 7-72 anos; 83 mulheres, 31±15 anos, 5-70 anos): 125 amostras foram obtidas imediatamente antes de os voluntários irem dormir (noite) e 122 amostras obtidas imediatamente após acordarem (manhã).

Colheita de saliva: A saliva foi colhida, antes da lavagem dos dentes, para tubos Salivette tratados com ácido cítrico (Sarstedt, Numbrecht, Germany) e mantida no frigorífico, em casa do voluntário. No laboratório, as amostras foram centrifugadas (1600 g, 18°C, 10 minutos) e armazenadas

das a -20°C até se proceder ao doseamento do cortisol.

Determinação dos intervalos de referência: Por convenção, o intervalo de referência é definido como o intervalo central de 95%, ladeado pelos percentis 2.5 e 97.5. Foi utilizada a abordagem não paramétrica, através do método dos “rank numbers”, para estimar estes percentis.

O método Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks (ANOVA) foi utilizado para testar a diferença entre sexos. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Estudos em doentes: Foram revistos 214 processos clínicos de doentes inscritos na Consulta de Endocrinologia do IPO a quem foram pedidos doseamentos de cortisol salivar entre Janeiro de 1998 e Janeiro 2009. Destes foi possível seleccionar 116 processos por conterem informação susceptível de ser trabalhada. Estes foram agrupados nas seguintes categorias: Hiperfunções do córtex supra renal (23); Doença de Addison (2); Adenomas da supra renal sem evidência clínica de hiperfunção (26); Patologia variada não relacionada com a supra renal (60).

#### RESULTADOS

Determinação dos intervalos de referência para o cortisol salivar: Três amostras obtidas à noite e duas obtidas de manhã e foram consideradas “outliers” e excluídas.

O intervalo de referência estimado para o cortisol salivar é mais elevado de manhã do que à noite: manhã 2.6–60.7 nmol/L (n=120); noite 1.0–14.9 nmol/L (n=122).

Estes intervalos de referência são muito diferentes dos fornecidos pelo fabricante (manhã 6.2-38.1 nmol/L; n=28; noite 0.6–4.9 nmol/L; 18-20h; n=28;).

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas para a concentração de cortisol salivar, entre homens, mulheres e

a totalidade do grupo (noite  $p=0.471$ ; manhã  $p=0.945$ ; Homens: mediana manhã = 19.3 nmol/L; mediana noite = 2.3 nmol/L; Mulheres: mediana manhã = 19.7 nmol/L; mediana noite = 2.6 nmol/L)

## RESULTADOS EM DOENTES

Síndrome de Cushing: A tabela I. contém os resultados obtidos em 23 doentes com hiperfunção cortico supra renal. Todos eles tinham sintomatologia clínica sugestiva de hiperfunção supra renal e mais do que dois doseamentos de cortisol urinário

e/ou provas de supressão com dexametasona consistentes com o diagnóstico de Síndrome de Cushing.

Nas 23 medições feitas apenas 4 valores de cortisol das 23 H foram incluídos dentro dos limites da normalidade o que dá uma sensibilidade ao método de 82.6 %.

Nas 19 medições que incluíram o cortisol salivar das 9 h houve 14 que se situaram dentro dos limites da normalidade o que dá uma sensibilidade ao método de 26.3%.

Há uma correlação positiva significativa ( $R=0,6$ ) entre os valores de cortisol salivar às 23h e os valores do cortisol urinário.

TABELA I: Doseamento de ACTH, cortisol salivar e urinário em 23 doentes com Síndrome de Cushing

Doente	Cortisol Salivar (nmol/L)		Cortisol urinário (nmol/24h)	ACTH (pg/ml)	Diagnóstico
	Manhã (9h)	Noite (23h)			
Doença de Cushing					
1	31,2	28,3	797	116	Doença de Cushing
2	32,5	26,8	990	-	Doença de Cushing
3	11,1	27,2	1126	31,9	Doença de Cushing
4	27,2	100	596	8,0	Doença de Cushing + hiperplasia supra renal macronodular
5	100	35,2	2683	24,4	Doença de Cushing Ciclica (em actividade)
6	72,7	55,0	4463	151	Doença de Cushing Ciclica (em actividade)
7	22,6	38,8	1413	-	Cushing's disease
8	-	14,1	422	28,7	Cushing's disease
9	29,7	7,1	516	43,0	Doença de Cushing Ciclica (em actividade)
10	31,2	28,6	764	63,0	Doença de Cushing
11	36,8	13,5	538	101	Doença de Cushing
Síndrome de Cushing ectópico					
12		53,3	833	63,0	Tumor neuroendócrino Pulmão
13	>100	>100	7521	620	Tumor neuroendocrino do Timo
Síndrome de Cushing por adenoma da supra-renal					
14	61,3	38,8	974	< 5	Adenoma supra renal esquerda – 5 cm
15	22,6	22,2	1228	10,8	Adenoma supra renal direita– 3cm
16	>100	48,2	337	-	Carcinoma supra renal direita
17	54,8	32,1	499	< 16	Adenoma supra renal esquerda 4 cm
18	-	28,8	588	< 5	Carcinoma supra renal esquerda – 8 cm
19	-	24,6	290	28,0	Adenoma supra renal direita – 1,5 cm
20	51,1	73,7	1904	< 16	Adenoma supra renal esquerda – 4,5 cm
21	26,9	18,7	375	-	Adenoma supra renal esquerda – 2,5 cm
22	49,2	19,2	580	< 16	Carcinoma supra renal esquerda – 5,5 cm
23	2,6	11,0	334	-	Adenoma supra renal esquerda – 2 cm

Doença de Addison: Nos dois doentes com doença de Addison os valores de cortisol salivar às 9:00 foram ambos < 1,3 nmol/l.

Adenomas da supra-renal sem evidência clínica sugestiva de hiperfunção (incidentalomas): A tabela II. contém os resultados obtidos em doentes com evidência imagiológica de massa na supra renal sem sintomas ou sinais de hipercortisolismo. Em 18 de 26 doentes o cortisol urinário e salivar

das 23 horas estava dentro dos parâmetros da normalidade. Nos doentes com doseamento elevado de cortisol urinário a avaliação subsequente foi negativa para Síndrome de Cushing. Três doentes obtiveram doseamentos elevados de cortisol urinário em mais de uma ocasião, sempre com cortisol salivar das 23 h normal. Opostamente, dois doentes com cortisol urinário normal tiveram doseamentos de cortisol salivar das 23 horas elevado.

TABELA II: Doseamento de ACTH, cortisol salivar e urinário em nódulos da supra renal, sem evidência de hiperfunção.

Doente	Cortisol Salivar (nmol/L)		Cortisol urinário (nmol/24h)	ACTH (pg/ml)	Diagnóstico
	Manhã (9h)	Noite (23h)			
Nódulos da Supra-renal					
24	8,5	1,4	158	15,0	Nódulo supra renal esquerda – 1 cm
25		15,0	77	12,0	Nódulo supra renal direita – 4 cm
26		1,8	223	11,5	Nódulo supra renal direita– 2 cm
27	30,7	33,0	102	-	Nódulo supra renal esquerda– 2 cm
28	33,0	11,3	87	-	Nódulo supra renal direita– 1,7mm
29	6,4	12,9	86	<17,5	Nódulo supra renal direita– 4,4 mm
30	11,4	4,4	43	-	Quisto hemorrágico supra renal esquerda– 2,5 cm
31	5,0	9,5	145	26,3	Nódulo supra renal esquerda– 2 cm
32	35,8	4,9	152	11,7	Nódulo supra renal esquerda– 4,2 cm
33	9,6	3,6	97	-	Nódulo supra renal direita– 2 cm
34	88,5	20,5	80	17,2	Adenoma supra renal direita – 5 cm
35	20,9	9,0	120	<10	Nódulo supra renal esquerda – 2,5 cm
36		4,6	177	<16,2	Nódulos supra renal direita e esquerda
37	11,6	3,6	152	<16,2	Nódulo supra renal direita– 1,8 cm
38		7,0	188	-	Nódulo supra renal direita – 4,4 cm
39		6,2	222	14,4	Nódulo supra renal esquerda– 2,9 cm
40		<1,3	57	-	Linfangioma da supra renal esquerda – 3,2 cm
41	11,3	3,2	103	17,1	Nódulo supra renal direita – 1,5 cm
42		8,3	83	13,2	Nódulo supra renal direita – 2,2 cm
43	13,2	5,1	138	-	Nódulo supra renal direita – 3,8cm
44	9,5	6,1	378	10,5	Adenoma supra renal direita – 5 cm
45	18,5	2,5	566	11,7	Nódulo supra renal esquerda – 2,6 cm
46		2,4	326	16,0	Nódulo supra renal esquerda – 2 cm
47	12,7	2,2	272	-	Nódulo supra renal esquerda – 2,4 cm
48	20,8	4,0	373	-	Nódulo supra renal direita – 2,7 cm
49	15,7	8,8	555	< 1,3	Nódulo supra renal esquerda– 3,5 cm

Nota: A designação “nódulo” significa que os doentes não foram operados e as dimensões foram avaliadas por imagiologia.



Doentes variados sem patologia da supra renal: Foram revistos 60 doentes variados sem patologia da supra renal, todos com medição de cortisol salivar e urinário no mesmo dia. Cinco tinham valores de cortisol urinário > 250 nmol /24h o que dá uma especificidade para este método e este cut-off de 92%. Dos 47 a quem foi medido o cortisol salivar das 23 h, seis tinham valores acima do cut-off de 14.9 nmol o que dá uma especificidade de 87%. Curiosamente, um dos pacientes com cortisol salivar elevado (19,6 e 96,5 nmol/L) e cortisol urinário normais (166 and 119 nmol/24h) tinha um MEN1 com um tumor pancreático e hiperparatiroidismo. As razões desta anomalia não foram esclarecidas.

Dos 46 a quem foi medido o cortisol salivar das 9 h, só um tinha valores acima do

cut-off de 60.7 nmol /l o que dá uma especificidade, para hiperfunção, de 98% (embora com baixa sensibilidade) e três tinham valores abaixo do valor de referência conferindo ao método uma especificidade de 91%.

## DISCUSSÃO

Valores normais: Tal como referido por outros autores, não observamos diferenças entre géneros nem a existência de correlação significativa entre a concentração de cortisol salivar e a idade<sup>8,9,10,11,12</sup>.

Os intervalos de referência por nós determinados para o cortisol salivar foram superiores aos referidos por outros autores (tabela III).

TABELA III: Intervalos de referência para o cortisol salivar de outros autores.

Cortisol Salivar (nmol/L)		Método	Método colheita	Referência
Manhã	Noite			
2.6–60.7 (n=120)	1.0–14.9 (n=122)	RIA/Cort-CT2	Salivette tratado com ácido cítrico	Presente trabalho
7.0–19.8 (n=58)	1.7–5.4 (n=58)	Elecsys	Salivette	Van Aken (03)
3.5–27.0 (n=197)	<6.0 (n=197)	RIA/Coat-A-Count	Salivette	Aardal (95)
4.7–32.0 (n=73)	<0.4–3.6 (n=73)	RIA/Coat-A-Count	Salivette	Raff (98)
3.6–35.1 (n=120)	<10.3 (n=120)			Hansen (03)
M 9.3–40.3 (n=120) H 10.9–40.3 (n=128)		RIA	Poliesterene tubes	Patel (04)

M: Mulheres; H: homens.

É de referir que o método e o modo de colheita de saliva utilizados não são os mesmos, estando bem documentada a influência destes dois factores nos resultados<sup>13,14,15</sup>.

Como a tabela III ilustra é essencial que cada laboratório estabeleça os seus intervalos de referência.

Disfunções da supra renal: A avaliação não invasiva do cortisol “livre” circulante, através da sua excreção pela saliva, a qualquer hora e tantas vezes quantas necessárias permite o estudo do ritmo circadiano e da resposta a estímulos sem o recurso a internamento hospitalar, traumatizante e dispendioso. Isto é sobretudo útil no estudo

das hiperfunções do córtex da supra-renal uma vez que a presença de valores elevados é mais discriminante de noite, quando os valores normais são mais baixos.

Nas hipofunções a discriminação entre o normal e o patológico é melhor de manhã uma vez que os valores baixos sobressaem mais quando os valores fisiológicos são mais elevados.

Vários estudos têm convergido para a conclusão de que a medição do cortisol à noite (23:00 h – 24:00 h) é um excelente método de rastreio do hipercortisolismo tendo uma sensibilidade que pode chegar aos 93% e uma especificidade que pode che-

gar aos 100%. Por isso o doseamento do cortisol salivar pela meia noite é recomendado, a par do doseamento do cortisol urinário, pelas Guidelines para o diagnóstico de Síndrome de Cushing da Endocrine Society, americana<sup>16</sup>.

O desempenho do cortisol salivar à noite no rastreio das hiperfunções da supra renal tem sido comparável ou superior ao do cortisol urinário das 24 horas nas várias séries em que esta comparação foi feita no diagnóstico inicial ou nas recidivas pós cirurgia das hiperfunções da supra renal<sup>17,18</sup>. Na nossa série a sensibilidade foi de 83% e a especificidade de 87 %.

Está bem estabelecido que alguns “incidentalomas” da supra renal podem ser funcionantes e ter implicações – osteoporose e síndrome metabólica - mesmo quando a apresentação clínica não é sugestiva<sup>19</sup>. Há algum consenso em que a definição de “funcionante” depende da presença de dois dos seguintes três critérios: cortisol urinário elevado, ACTH suprimido e não supressibilidade do cortisol sérico às 9 horas após administração de 1mg de dexametasona ao deitar<sup>19</sup>.

Dois trabalhos recentes referem que o doseamento do cortisol salivar é pouco sensível no diagnóstico do hipercortisolismo sub-clínico que ocorre em alguns doentes com incidentaloma da supra-renal<sup>17,20</sup>. A nossa experiência nestes casos foi semelhante.

Dos 26 doentes com adenomas hipodensos do córtex da supra renal, sem clínica, e em que foi medido o cortisol urinário, 22 tiveram valores dentro da normalidade. Nos restantes quatro doentes os valores de cortisol urinário variaram entre 273 e 566 nmol/24 h. Em três deles em que os ensaios foram repetidos os valores de cortisol urinário foram elevados em mais de uma ocasião. Todos eles tiveram valores normais de cortisol salivar às 23 h.

Uma explicação plausível para os nossos dados, tal como para os observados por Nunes (2009) e Masserini (2009) é a possibilidade de alguns destes adenomas terem

receptores aberrantes<sup>17,20</sup>. Têm sido descritos receptores aberrantes com respostas hormonais a ligandos vários: GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide), LH/hGH, vasopressina, cisapride, nas hiperplasias macronodulares da supra-renal ACTH independentes mas também em adenomas funcionantes isolados e em muitos incidentalomas<sup>21,22,23</sup>. Nestes casos, e de acordo com o estímulo em causa, pode haver períodos de hipersecreção que se reflectem no cortisol urinário, mas que não são observáveis às 23h.

Por estas razões, não é de estranhar que, em condições marginais e na ausência de um padrão fiável de diagnóstico, o doseamento do cortisol salivar tenha um valor diagnóstico limitado na caracterização dos adenomas aparentemente não funcionantes da supra-renal. Parece-nos ser legítimo concluir que o doseamento do cortisol salivar às 23 h é um excelente método na caracterização de hiperfunções da supra-renal. Os limites do seu valor foram atrás explicitados.

No entanto, na prática clínica, as maiores dificuldades no rastreio de hiperfunção corticosuprarenal provém de duas origens: 1 – Com frequência a hiperfunção supra renal é episódica, como ilustramos em três dos nove casos de Síndrome de Cushing que estudámos; 2 – Formas ligeiras de hiperfunção podem não ser detectadas, sobretudo se a secreção é intermitente e não abranje o período da noite. No primeiro caso, melhor do que o recurso a um método ideal, é a possibilidade e acompanhar os doentes com doseamentos repetidos ao longo do tempo. É evidente que a colheita do cortisol salivar à noite, pela sua comodidade, é um instrumento ideal para este tipo de rastreios. No segundo caso vale a pena procurar obter valores de cortisol salivar (ou sérico) a várias horas do dia procurando identificar algum padrão temporal, como, por ex. picos de cortisol no período pós prandial.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009 Feb; 34(2): 163-71
2. Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guillaume B, Luton JP. Salivary cortisol measurement: a practical approach to assess pituitary-adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 1988 66 343 – 348
3. Clements AD, Parker CR. The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 Aug;23(6):613-6
4. Meulenberg PMM, Hofman JA. Differences between concentrations of salivary cortisol and cortisone and of free cortisol and cortisone in plasma during pregnancy and postpartum. *Clin Chem* 1990 36 70 – 75
5. Morineau G, Boudi A, Barka A, Gourmelen M, Degeilh F, Hardy N, al-Halnak A, Soliman H, Gosling JP, Julien R, Brerault JL, Boudou P, Aubert P, Villette JM, Pruna A, Galons H, Fiet J. Radioimmunoassay of cortisone in serum, urine and saliva to assess the status of the cortisol cortisone shuttle. *Clin Chem* 1997 43 1397-1407.
6. Quinkler M, Stewart PM. Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 88 2384–2392.
7. Kathol RG, Poland RE, Stokes PE, Wade S. Relationship of 24 hour urinary free cortisol to 4-hour salivary morning and afternoon cortisol and cortisone as measured by a time-integrated oral diffusion sink. *J Endocrinol Invest* 1995 18 374 – 377.
8. Raff H, Raff JL, Findling JW. Late-Night Salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 83 2681-2686
9. van Aken MO, Romijn JA, Miltenburg JA, Lentjes GWM. Automated measurement of salivary cortisol. *Clin Chem* 2003 48 1408-1409
10. Hansen AM, Garde AH, Christensen JM, Eller NH, Netterstrøm B. Evaluation of a radioimmunoassay and establishment of a reference interval for salivary cortisol in healthy subjects in Denmark. *Scand J Clin Lab Invest* 2003 63 303-310
11. Safarzadeh E, Mostafavi F, Ashtiani MTH. Determination of salivary cortisol in healthy children and adolescents. *Acta Medica Iranica* 2005 43 32-36
12. Patel RS, Shaw SR, MacIntyre H, McGarry GW, Wallace AM. Production of gender-specific morning salivary cortisol reference intervals using internationally accepted procedures. *Clin Chem Lab Med* 2004 42 1424-1429
13. Aardal E, Holm AC. Cortisol in saliva ? Reference ranges and relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995 33 927-932
14. Raff H, Homar PJ, Burns EA. Comparison of two methods for measuring salivary cortisol. *Clin Chem* 2002 48 207-208
15. Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, Yagmur E. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clin Chim Acta* 2007 382 15-19
16. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome; An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 93; 1526- 1540
17. Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB, Rault A, Loiseau H, Gatta B, Valli N, Letenneur L, Tabarin A. Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 94 456- 462
18. Carrasco CA, Coste J, Guignat L, Groussin L, Dugué MA, Gaillard S, Bertagna X, Bertherat J. Midnight salivary cortisol determination for assessing the outcome of transphenoidal surgery in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 93 4728 – 4734
19. Chiodini I, Morelli V, Masserini B, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Viti R, Coletti F, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Iorio L, Beck-Peccoz P, Arosio M, Ambrosi B, Scillitani A. Bone mineral density, prevalence of vertebral fractures and bone quality in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism: an Italian multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 94 3207- 3214.
20. Masserini B, Morelli V, Bergamaschi S, Ermetici F, Eller-Vainicher C, Barbieri AM, Maffini MA, Scillitani A, Ambrosi B, Beck-Peccoz P, Chiodini I. The limited role of midnight salivary cortisol levels in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 2009 160 87 -92.
21. Reznik Y, Lefebvre H, Rohmer V, Charbonnel B, Tabarin A, Rodien P, Lecomte P, Bardet S,

- Coffin C, Mahoudeau J; REHOS study group. Aberrant adrenal sensitivity to multiple ligands in unilateral incidentaloma with subclinical autonomous cortisol hypersecretion: a prospective clinical study. *Clin Endocrinol* 2004 (Oxf) 61 311-9.
22. Bugalho MJM, Li X, Rao Ch V, Soares J, Sobrinho LG. Presence of a Gs- mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2000 14 50-54.
  23. Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn JM, Vaudry H, Lefebvre H. In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 90 1302-1310.

# Estudo de Validação de Instrumento de Avaliação da Imagem Corporal de Crianças/Adolescentes com idades compreendidas entre os 6-12 anos e seus Progenitores

## *Body image perception among children and adolescents 6-12 years old and their parents - a validation study*

Diana e Silva<sup>1</sup>, Carla Rego<sup>1,2</sup>, Ana Valente<sup>3</sup>, Carla Vasconcelos<sup>1</sup>, Inês Tomada<sup>3</sup>, Claudia Dias<sup>4</sup>, Luís Filipe Azevedo<sup>4</sup>, Carla Martins<sup>5</sup>, António Guerra<sup>1,2,3</sup>, Altamiro Costa Pereira<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Unidade de Nutrição – UAG da Mulher e da Criança / H S. João

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina da UP

<sup>3</sup> Faculdade Ciências da Nutrição e Alimentação da UP

<sup>4</sup> Serviço de Bioestatística e Informática Médica da Faculdade de Medicina da UP

<sup>5</sup> Instituto de Educação e Psicologia Universidade do Minho

**Correspondência:** Diana Silva › Unidade Autónoma de Gestão - da Mulher e da Criança › Hospital S. João › Alameda Hernâni Monteiro › 4200-415 PORTO › silvaqueiroga@netcabo.pt

**Aceitação:** Artigo recebido em 02/09/2010, revisto em 21/10/2010 e aceite para publicação em 07/01/2011.

### RESUMO

**Introdução:** A auto-avaliação da imagem corporal tendo como objectivo a sua utilização terapêutica implica uma correcta adaptação e validação de instrumentos adequados para a sua medição. É objectivo a validação da escala da imagem corporal em crianças/adolescentes portugueses saudáveis.

**Material e Métodos:** Foram estudadas 329 crianças e adolescentes saudáveis (6-12 anos) de ambos os sexos e seus progenitores de 3 zonas geográficas. Para a avaliação da imagem corporal foi utilizada um modelo constituído por 7 imagens de crianças/adolescentes e adultos de ambos os sexos. Foi aplicada uma escala de satisfação corporal constituída por 18 itens relativos às diferentes partes do corpo, e foram avaliados os estados nutricionais das crianças e progenitores. A análise estatística foi delineada com o objectivo de avaliar a reprodutibilidade e validade dos instrumentos em análise.

**Resultados:** Tanto nas crianças/adolescentes como nos seus progenitores observam-se resultados satisfatórios de reprodutibilidade teste-reteste em relação a: Qual a figura que achas que tens? [criança/adolescente – Kappa ponderado ( $\kappa_p$ ) = 0,774 e IC 95%=(0,727-0,821); mãe  $\kappa_p$  = 0,718 e IC 95%=(0,646-0,789); pai  $\kappa_p$  = 0,671 e IC 95%=(0,577-0,764)]; Qual a figura que gostarias de ter? [criança/adolescente –  $\kappa_p$  = 0,604 e IC 95%=(0,537-0,671); mãe  $\kappa_p$  = 0,466 e IC 95%=(0,359-0,573); pai  $\kappa_p$  = 0,472 e IC 95%=(0,349-0,595)]. Existe uma importante e significativa correlação entre a IC que a criança/adolescentes e seus progenitores escolhem e o seu IMC (criança/adolescente  $r$  = 0,749 ( $p < 0.001$ ); mãe:  $r$  = 0,772 ( $p < 0.001$ ) e pai  $r$  = 0,735 ( $p < 0.001$ )).

**Conclusões:** Os resultados obtidos confirmam a validade e reprodutibilidade da escala da imagem corporal utilizada neste estudo, podendo esta ser aplicada a crianças/adolescentes portugueses neste grupo etário e seus progenitores.

### PALAVRAS-CHAVE

Imagem corporal; Validação; Criança e Adolescente; Progenitores.

**ABSTRACT**

*Introduction: The self-evaluation of the body image (BI) has as a goal its therapeutic use and implies a correct adaptation and validation of instruments adjusted for its measurement.*

*Aim: The validation of the BI scale for healthy Portuguese children/adolescents.*

*Population: Three hundred and twenty-nine (329) healthy children and adolescents (6-12 years) of both sexes and their parents were studied from 3 different geographic zones.*

*Methods: For the evaluation of the BI, a model was used consisting of 7 images of children/adolescents and adults. The scale of corporal satisfaction (SCS) is constituted by 18 items relative to different parts of the body. The statistical analysis was defined in terms of the objective of the study.*

*Results: A satisfactory test-retest of reproducibility was observed through the choices of the children/adolescent and parents in relation to: What body image do you think you have? [children/adolescent - weighted Kappa = 0,774 and BI 95% = (0,727-0,821); mother weighted Kappa = 0,718 and BI 95% = (0,646-0,789); father weighted Kappa = 0,671 and BI 95%=(0,577-0,764) ]; What body image would you like to have? [ children/adolescent - weighted Kappa = 0,604 and BI 95% = (0,537-0,671); mother weighted Kappa = 0,466 and IC 95%=(0,359-0,573); father weighted Kappa = 0,472 and BI 95%=(0,349-0,595) ]. A significant correlation exists between the body image that children and their parents have and their BMI in reality (children/adolescents  $r = 0,749$  ( $p < 0.001$ ); mother:  $r = 0,772$  ( $p < 0.001$ ) and father  $r = 0,735$  ( $p < 0.001$ )).*

*Conclusions: The obtained results confirm the validity and reproducibility of the scale of the BI used in this Portuguese study and it could be applied to children/adolescents of these groups of ages and your parents.*

**KEYWORDS**

*Body Image; Validation; Children and Adolescents; Parents.*

**INTRODUÇÃO**

Desde idades muito jovens que se manifesta uma enorme preocupação com o peso e a imagem corporal. Estas alterações refletem-se, na maioria das vezes, de uma forma negativa na relação com a família e a sociedade<sup>1,2</sup>.

É do conhecimento geral que a insatisfação com a imagem corporal na infância e na adolescência pode ser factor de risco para o desenvolvimento de algumas alterações do comportamento alimentar, bem como uma diminuída auto-estima<sup>3,4</sup>.

Quando se pretende relacionar o excesso de peso vs imagem corporal, é importante considerar a idade em que os rapazes e as raparigas começam a sua auto-avaliação, não só em relação a si próprios, como tam-

bém em relação a todos elementos do grupo<sup>5</sup>. O desejo de melhorar a imagem corporal pode ser uma forma de motivação para iniciar um programa de perda de peso<sup>6</sup>.

A implementação da auto-avaliação da imagem corporal desde idades muito precoces, parece ser uma mais valia como terapêutica coadjuvante no tratamento da obesidade<sup>2,7</sup>. Torna-se fundamental a realização de um maior número de estudos sobre a auto-avaliação da imagem corporal em crianças e adolescentes, de forma a criar novas estratégias de intervenção na abordagem e manipulação do tratamento da obesidade em idade pediátrica<sup>8,9</sup>.

A realização deste tipo de estudos implica, no entanto, em primeiro lugar, a correcta adaptação e validação de instrumentos

adequados para a medição da auto-avaliação da imagem corporal. A auto-avaliação por observação de diferentes tipos de silhuetas é um dos métodos de avaliação da imagem corporal mais usual. Esta é efectuada através da apresentação de fotografias ou desenhos de imagens corporais, que vão desde a magreza até obesidade, sendo o protocolo de Collins um dos mais utilizados na auto-avaliação da imagem corporal de crianças/adolescentes e seus progenitores<sup>2</sup>.

Reconhecendo ser da maior importância o incremento na realização de um maior número de estudos sobre a auto-avaliação da imagem corporal em idades muito jovens, foi objectivo do presente trabalho proceder à validação da escala aqui apresentada (Quadro1), através da adequada avaliação da sua reprodutibilidade e validade.

## MATERIAL E METODOS

A amostra analisada é constituída por 329 crianças e adolescentes saudáveis de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 6 – 12 anos e seus progenitores (Mãe=233; Pai= 147), provenientes de 3 agrupamentos escolares do 1º e 2º ciclos, pertencentes a 3 zonas geográficas distintas de Portugal Continental: uma região rural; uma região suburbana e uma região urbana.

Tendo por base a totalidade dos alunos que frequentam o 1º e 2º ciclos de três agrupamentos escolares: Eugénio de Andrade – Paranhos; Escultor António F. Sá – Oliveira do Douro; Dr. Leonardo Coimbra – Lixa, das três zonas geográficas: Urbana; Suburbana e Rural respectivamente. A amostra foi aleatoriamente seleccionada mediante a listagem do número de alunos de cada turma correspondentes aos dois ciclos em cada agrupamento. Foram convocados 50 alunos de cada um dos ciclos escolares e seus progenitores, no total de 100 alunos por agrupamento e zona geográfica. Previamente foi enviada uma carta à criança/adolescente e seus progenitores com a marcação da 1ª

avaliação e 5 dias depois procedeu-se à 2ª avaliação. Crianças e adolescentes e seus encarregados de educação foram esclarecidos acerca dos objectivos do trabalho e do direito à recusa em participar, e de acordo com a *Declaração de Helsínquia*, foi assinado o consentimento informado de cada participante no estudo<sup>10</sup>.

Todas as avaliações foram efectuadas de acordo com a metodologia e técnicas internacionalmente recomendadas. Crianças/adolescentes e progenitores foram entrevistados individualmente e a equipe técnica submetida a treino específico, de forma a uniformizar critérios de avaliação e metodologias de trabalho.

Procedeu-se à aplicação de um protocolo de Avaliação da Imagem Corporal e da Satisfação corporal em relação a dada criança/adolescente e seus progenitores.

A caracterização do estado nutricional das crianças/adolescentes, foi calculado pelo Índice de Massa Corporal (IMC) de Quetlet ( $\text{Peso}/\text{Estatura}^2$ ) assim como o Zs do IMC, utilizando como padrão de referência as tabelas do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)<sup>11</sup>.

O estado nutricional dos progenitores foi caracterizado com base no IMC, calculado através da avaliação antropométrica realizada no momento da entrevista. Para a determinação do grau de obesidade destes foi utilizada a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>12</sup>.

O modelo escolhido para a avaliação da imagem corporal de Collins<sup>2</sup>, é constituído por 7 imagens de crianças/adolescentes e adultos de ambos os sexos, compreendidas entre a magreza (F1) e a obesidade (F7) que permite caracterizar de uma maneira fácil a auto-avaliação da imagem corporal tanto em idades pediátricas como em adultos. Esta avaliação foi obtida de uma forma individual, após observação das respectivas figuras. Procedeu-se à correspondência da imagem corporal relativamente ao IMC actual da criança/adolescente e seus progenitores<sup>9</sup>.

Utilizou-se a escala de Marsella para a determinação da satisfação da imagem corporal. Esta escala é constituída por 18 itens relativos às diferentes partes do corpo, classificados segundo uma pontuação de 1 a 7<sup>13</sup>.

O plano da análise estatística a aplicar foi definido em função dos objectivos do estudo. Assim, a análise estatística teve como objectivo a validação da escala de auto-avaliação da imagem corporal e incluiu a avaliação da reprodutibilidade teste-reteste do instrumento, avaliação da validade de critério, avaliação da validade de construto e, adicionalmente, foi feita uma análise das diferenças entre a auto-imagem corporal e a imagem corporal ideal (através do cálculo de um *score* de discrepância).

Foi feito previamente o cálculo do tamanho da amostra que seria necessário estudar em função dos objectivos estabelecidos (mínimo 200 indivíduos), de forma a garantir a detecção da significância de coeficientes de validade e reprodutibilidade de valor igual ou superior a 0.2 e uma margem de erro máxima na estimação dos intervalos de confiança de aproximadamente 0.1, considerando-se um nível de confiança de 95% e um poder de 85%<sup>14</sup>.

A análise estatística deste estudo incluiu, deste modo, as seguintes fases:

- 1- Avaliação da reprodutibilidade teste-reteste da escala de auto-avaliação da imagem corporal através do cálculo dos coeficientes de reprodutibilidade de teste-reteste
  - Cálculo dos coeficientes de reprodutibilidade teste-reteste (estatística kappa ponderada), entre a avaliação inicial e a avaliação feita 7 dias depois, na globalidade da amostra e para cada uma das selecções de figuras a avaliar;
- 2- Avaliação da reprodutibilidade teste-reteste em função do sexo e idade;
- 3- Avaliação da validade de critério da escala de auto-avaliação da imagem corporal através do cálculo dos coeficientes de validade:

- Entre a escala de auto-avaliação da imagem corporal e o peso real da criança;
- Entre a escala de auto-avaliação da imagem corporal e o seu índice de massa corporal;

4- Avaliação da validade de construto da escala de auto-avaliação da imagem corporal, no respeitante à satisfação com a imagem corporal, através do cálculo dos coeficientes de validade:

- Entre a escala de auto-avaliação da imagem corporal e os scores e subscores da escala de satisfação da imagem corporal (Marsella et al,1981);
- Entre o score de discrepância (auto-imagem corporal menos imagem corporal ideal) e os scores e subscores da escala de satisfação da imagem corporal (Marsella et al,1981);
- Entre esta escala de auto-avaliação da imagem corporal e as respostas verbais a questões sobre a auto-imagem corporal e a imagem corporal ideal;

5- Análise das diferenças entre a auto-imagem corporal e a imagem corporal ideal em função do sexo, idade, nível socio-económico e região geográfica:

## RESULTADOS

### 1. POPULAÇÃO

A totalidade da amostra (329) encontra-se distribuída por três zonas geográficas: Urbana=108; Suburbana=102 e Rural = 119. Observa-se uma distribuição equitativa por ambos os sexos (M=56,2%; F= 43,8%) e com uma idade cronológica média de 10,04 ( $\pm 1,5$  anos), sendo mínima de 6 e máxima de 12 anos. No que se refere aos progenitores (Pai=147;Mãe=233) que aceitaram parti-



cipar no estudo, a idade média da mãe é  $38,6 \pm 5,9$  anos e do pai de  $40,9 \pm 6,9$  anos.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

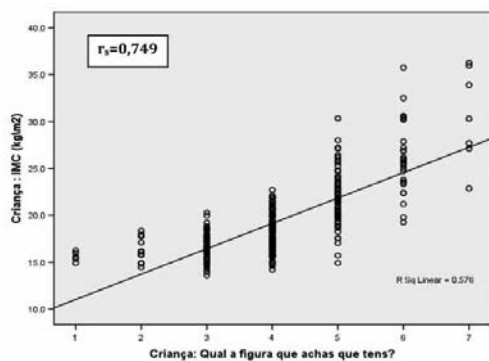
A caracterização do estado de nutrição, expressa em Z-Score de IMC aponta para valores de IMC mais elevados nas zonas suburbanas e rurais tanto para os rapazes (Z-Score=0,75) como para as raparigas (Z-Score=0,7).

Tendo por base a classificação da OMS, verifica-se uma elevada percentagem de excesso de peso/obesidade nos progenitores nas três zonas geográficas estudadas (Pai=39%; Mãe=61%).

## 3. IMAGEM CORPORAL

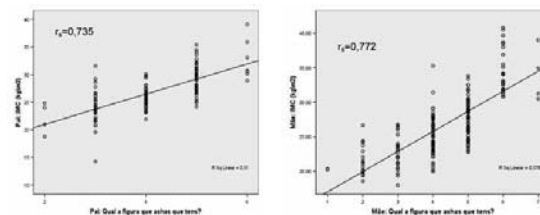
Existe uma importante e significativa correlação entre a imagem corporal que a criança ou o adolescente e seus progenitores escolhem e o IMC: criança/adolescente:  $r=0,749$ ; mãe:  $r=0,735$  e pai:  $r=0,772$  (Figura 1 e Figura 2).

FIGURA 1: Criança/adolescente (n=329). Estudo de correlação (coeficientes de correlação de Spearman –  $r_s$ ) entre a imagem corporal que acha que tem e o IMC correspondente.



Tanto nas crianças como nos adolescentes e nos seus progenitores observam-se resultados satisfatórios de reprodutibilidade teste-reteste em relação a: Qual a imagem que a criança ou o adolescente considera que tem? [criança/adolescente – Kappa ponderado=0,774 e IC 95%= (0,727-0,821);

FIGURA 2: Estudo de correlação (coeficientes de correlação de Spearman –  $r_s$ ) entre a imagem corporal que acha que a mãe (233) e o pai (147) tem e o IMC correspondente.



mãe Kappa ponderado=0,718 e IC 95%= (0,646-0,789); Pai Kappa ponderado=0,671 e IC 95%= (0,577-0,764)]; Qual a imagem que a criança ou o adolescente gostaria de ter? [criança/adolescente – Kappa ponderado=0,604 e IC 95%= (0,537-0,671); mãe Kappa ponderado=0,466 e IC 95%= (0,359-0,573); Pai Kappa ponderado=0,472 e IC 95%= (0,349-0,595)] (Quadro I).

QUADRO I: Criança/adolescente (n=329) e Progenitores (Mãe=233; Pai=147). Estudo de reprodutibilidade (teste-reteste) da Imagem Corporal

	Criança	Mãe	Pai
<b>Qual a figura que achas que tens</b>			
que tens, Kappa ponderado, [IC 95%]	0.774 [0.727-0.821]	0.718 [0.646-0.789]	0.671 [0.577-0.764]
<b>Qual a figura gostarias de ter</b>			
de ter, Kappa ponderado, [IC 95%]	0.604 [0.337-0.671]	0.466 [0.359-0.573]	0.472 [0.349-0.595]

Observam-se correlações elevadas entre a IC escolhida e o item relativo ao peso da escala de satisfação corporal: Criança (M  $r=0,329$  ( $p<0,001$ ) e F  $r=0,639$  ( $p<0,001$ )); Mãe  $r=0,593$  ( $p<0,001$ ) e Pai  $r=0,401$  ( $p<0,001$ ). Verificaram-se correlações fracas entre a IC escolhida e o score global da escala de satisfação (criança/adolescente  $r=0,177$  ( $p=0,001$ ); Mãe  $r=0,391$  ( $p<0,001$ ) e Pai  $r=0,188$  ( $p=0,029$ )) (Quadro II).

QUADRO II: Criança/adolescente (n=329) e Progenitores (Mãe=233; Pai=147). Estudo de correlação (coeficientes de correlação de Spearman –  $r_s$ ) entre a escala de IC vs ESC.

	Escala Satisfação Corporal – item peso	Escala satisfação Corporal – Score global
<b>Imagem corporal</b>		
Crianças/adolescentes	0.479	0.177
Rapazes	0.329	-
Raparigas	0.639	-
Mãe	0.593	0.320
Pai	0.401	0.188

## DISCUSSÃO

A avaliação da imagem corporal é um conceito multidimensional, onde percepções e sentimentos, mais ou menos conscientes, definem o corpo do indivíduo como um todo<sup>15</sup>.

A sociabilização também envolve modelos interpessoais relativos a aquisições de valores e atitudes acerca do aspecto físico. Alguns autores consideram mesmo que a localização geográfica e o nível sócio-económico e cultural dos pais podem contribuir para um aumento de ponderosidade na criança e no adolescente influenciando a percepção da imagem corporal<sup>16,17</sup>.

A preocupação com a imagem corporal manifesta-se desde idades muito precoces sobretudo em crianças e adolescentes do sexo feminino<sup>18,19</sup>. A insatisfação com o corpo não é somente relatada por parte das crianças e adolescentes com excesso de peso/obesidade ou magreza, mas cada vez mais este grupo etário valoriza a relação com o seu próprio corpo<sup>20</sup>.

A descrição verbal e a apreciação da imagem ao espelho são alguns dos métodos de avaliação da imagem corporal. Contudo a auto-avaliação por observação de diferentes tipos de silhueta é a mais usual. O modelo por nós escolhido, constituído por 7 figuras de ambos os sexos, permite caracterizar de uma maneira fácil a auto-avaliação da imagem corporal em crianças e adultos<sup>2, 21, 22</sup>. Neste caso, interessa especificamente adaptar um instrumento, já previamente construído, aos grupos etários mais jovens e ao nosso contexto linguístico, social e cultural.

Este trabalho de validação e adaptação é de fundamental importância, pois implica o estudo e avaliação das características fundamentais do instrumento quanto à validade de critério, fiabilidade e reprodutibilidade para o nosso contexto específico e para o grupo etário em causa. Estas características são importantes por permitirem avaliar a adequação e consistência das medições fei-

tas e permitirem verificar até que ponto o instrumento mede, de facto, aquilo que se pretende medir. Tanto nas crianças e adolescentes como nos seus progenitores por nós avaliados observam-se resultados bastante satisfatórios relativamente ao estudo de reprodutibilidade (Quadro I) o que significa que em tempos distintos obtivemos coerência entre as respostas.

A distorção da imagem corporal pode ser definida como forma de distúrbio afectivo, cognitivo, comportamental ou perceptivo que é influenciado directa ou indirectamente por aspectos da aparência física<sup>17</sup>. A auto-avaliação da imagem corporal representa uma experiência subjectiva e individual com o seu próprio corpo e a maneira como o indivíduo se organiza com esta realidade<sup>23</sup>. No trabalho realizado verifica-se uma elevada correlação entre o IMC do peso e a imagem corporal escolhida. À medida que o valor de IMC das crianças e dos adolescentes estudados são mais elevados estes identificam-se com figuras mais pesadas (F6 e F7). O mesmo se passa com os seus progenitores o que significa que esta escala está a medir aquilo que se pretende (Figura 1 e Figura 2). Muito embora seja a partir dos 8 anos de idade que o desenvolvimento lógico da criança lhe permita avaliar o seu auto-conceito em domínios específicos, não foram encontradas diferenças importantes, comparativamente com o total da amostra, quando considerada a subdivisão da população com idades inferiores a 8 (n=59) e superior a 8 anos de idade (n= 270).

O estudo da satisfação ou insatisfação para as diferentes áreas corporais tem diferentes origens, revestindo-se de uma forte influência dos meios de comunicação social ou mesmo de amigos e familiares<sup>13,24</sup>. Verifica-se nas crianças/adolescentes e seus progenitores por nós estudados uma boa correlação entre a escala de insatisfação corporal e o item peso da ESC (Quadro II). Apesar das correlações serem de grandezas

diferentes elas são significativas para o que se pretende medir, o que significa que, muito provavelmente, estamos a medir construtos muito aparentados ou um mesmo construto. O mesmo não se passa entre escala de insatisfação corporal e o score global da ESC o que leva a dizer que se trata, muito provavelmente, de construtos diferentes.

## CONCLUSÃO

Observa-se uma forte correlação entre o item – peso da Escala de Satisfação Corporal (ESC) e a Imagem Corporal, confirmando assim a validade da escala de imagem corporal.

A existência de baixas correlações com o índice global da ESC, sugerem a existência de um construto diferente em relação à utilização destas duas escalas e permitem concluir que a sua aplicação mede parâmetros diferentes.

Os resultados obtidos confirmam a validade e reprodutibilidade da escala de imagem corporal utilizada neste estudo, podendo esta ser aplicada a crianças e adolescentes portuguesas, neste grupo etário.

## BIBLIOGRAFIA

1. Jelliffe DB, Jelliffe EFP. Community Assessment: Direct assessment of nutrition status. Oxford University Press: Oxford, 1989.
2. Collins ME. Body figure perceptions and preferences among preadolescent children. *Int J Eat Disord* 1991; 10(2): 199-208.
3. Triches RM, Guigliani ERJ. Insatisfação corporal em escolares de dois municípios da região sul do Brasil. *Rev Nutr Campinas* 2007; 20(2): 119-128.
4. Moreno LA, Fleta J, Mur L, Feja C, Sarria A, Bueno M. Indices of body fat distribution in spanish children aged 4.0 to 14.9 years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 2(25): 175-181.
5. Tershakovec AM. Psychological considerations in pediatric weight management. *Obes Res* 2004; 12(10): 1537-1538.
6. Brook CGP. Determination of body composition in children skinfold measurements. *Arch Dis Child* 1971; 46: 182-184.
7. Lake A, Townshend T. Obesogenic environments: Exploring the built and food environments. *J Royal Soc Promot Health* 2006; 126(6): 262-267.
8. Hayden-Wado HA, Stein RJ, Ghaderi A, Saclens BE, Zabinski MF, Wiltley DE. Prevalence, characteristics and correlates of teasing experiences among overweight children vs non-overweight peers. *Obes Res* 2005; 13(8): 1381-1392.
9. Silva D, Valente A, Vasconcelos C, Dias C, Azevedo L, Guerra A. Imagem Corporal: auto-avaliação vs caracterização pelo IMC e seus progenitores. *Endocrinol Diab Obes* 2007; 1(2): 75-84.
10. Associação Médica Mundial – Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000.
11. Centers for Disease Control and Prevention (2000). CDC Growth Charts. . URL <http://www.cdc.gov/growthcharts>
12. World Health Organization. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO consultation on obesity: Geneve, 1997.
13. Marsella AJ, Shizuru L, Brennan J, Kameoka V. Depression and body image satisfaction. *J Cross-Cultural Psychol* 1981; 12(3): 360-371.

14. Streiner DL, Norman GR. Health measurement scales : a practical guide to their development and use. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2003.
15. Pinheiro AP. Insatisfação com o corpo com o corpo, auto-estima e preocupação com o peso em escolares de 8 a 11 anos de Porto Alegre (Dissertação). UFRGS: Porto Alegre, 2003.
16. Camolas J, Miranda AC. Factores preditores do ganho ponderal – o biológico e o comportamental. *Obes Diab e Complicações* 2002; 2(1): 39-41.
17. Ivarsson T, Svalander P, Litlere O, Nevonen L. Weight concerns, body image, depression and anxiety in Swedish adolescent. *Eat Behav* 2006; 7(2): 161-175.
18. Welch C, Gross SM, Bronner Y, Dewberry-Moore N, Paige DM. Discrepancies in body image perception among fourth-grade public school children from urban, suburban and rural Maryland. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 1080-1085.
19. O’De JÁ, Caputi P. Association between socioeconomic status, weight, age and gender, and the body image and weight control practices of 6- to – 19 years-old children and adolescents. *Health Educ Res* 2001; 16(5): 521-32.
20. AJ H, JA F. Mothers, daughters and dieting: investigation transmission of weight control. *Br J Clin Psychol* 1998; 37: 3-13.
21. Body image assessment for obesity (BIA-O): development of a new procedure. *Int J Obes* 2000; 24: 1326-32.
22. Rinderknecht K, Smith C. Body-image perceptions among urban native American Youth. *Obes Research* 2002; 10(5): 315-327.
23. McElhone S, Kearney JM, Giachetti I, Zunft HJF, Martínez JA. Body image perception in relation to recent weight changes and strategies for weight loss in a nationally representative sample in the European Union. *P Health Nut* 1999; 2(1a): 143-151.
24. Nowak M. The weight-conscious adolescent. *J Adol Health* 1998; 23(6):389-398.

*Com a colaboração de:*

Professores: Eunice Roque; Elisabete Moreira; António Grangeia.

*Com o patrocínio de:*

Nestlé Nutrition Institute

# Qualidade de vida: estudo de uma população com *diabetes mellitus* tipo 1

## *Quality of life: a study in a population with type 1 diabetes*

Ana Torres<sup>1</sup>, Miguel Fonte<sup>2</sup>, Vânia Martins<sup>2</sup>, Isabel Silva<sup>3</sup>, Helena Cardoso<sup>4</sup>, Carla Rocha<sup>5</sup>, Teresa Borges<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Interna Complementar de Pediatria – Unidade Local de Saúde do Alto Minho, EPE

<sup>2</sup> Interno Complementar de Pediatria – Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE

<sup>3</sup> Professora Associada da Universidade Fernando Pessoa

<sup>4</sup> Chefe de Serviço de Endocrinologia, <sup>5</sup> Enfermeira Especialista de Pediatria, <sup>6</sup> Assistente Hospitalar de Pediatria – Consulta de Endocrinologia Pediátrica - Centro Hospitalar do Porto (CHP) - Hospital Santo António, EPE

**Correspondência:** Ana Torres · Serviço de Pediatria · Unidade Local de Saúde do Alto Minho - Hospital de Santa Luzia · Estrada de Santa Luzia · 4901-858 VIANA DO CASTELO · ana\_leca\_torres@hotmail.com

**Aceitação:** Artigo recebido em 16/12/2010, revisto em 30/12/2010 e aceite para publicação em 30/12/2010.

### RESUMO

**Objectivos:** Avaliar a qualidade de vida (QV) das crianças e adolescentes com *diabetes mellitus* tipo 1; comparar a pontuação do doente com a parental; e identificar factores relacionados com a QV (idade, sexo, nível socioeconómico, duração da doença, controlo metabólico, regime de insulina e parâmetros psicológicos).

**Tipo de estudo:** transversal.

**População:** Dos 94 diabéticos tipo 1 seguidos em consulta de Endocrinologia Pediátrica, participaram no estudo 58 crianças e adolescentes com *diabetes mellitus* tipo 1 e respectivo pai/mãe acompanhante. Idades dos participantes compreendidas entre 3,7 e 18 anos (média 11,9±3,9 anos), sendo 55% do sexo masculino. Duração mediana da doença de 3,5 anos.

**Métodos:** Consulta do processo clínico para recolha de dados demográficos e dos específicos da doença. As crianças/adolescentes e seus pais preencheram o questionário respectivo do *Pediatric Quality of Life Inventory*<sup>®</sup> (*PedsQL*) – versão 3.0 módulo diabetes. Estudo de eventuais relações entre os parâmetros clínicos e demográficos e a QV.

**Resultados:** A QV total obtida foi 66,1±12,0 e 60,6±14,9, para os doentes e pais, respectivamente. Verificou-se pior pontuação nos questionários dos pais relativamente à QV total e aos itens «problemas com o tratamento» e «preocupações com a doença», tendo sido o último o pior. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos, nem relação estatisticamente significativa entre variáveis no que respeita ao sexo, idade, duração da doença, nível socioeconómico e regime intensivo de tratamento com insulina. A HbA1c revelou estar negativamente correlacionada com a QV.

**Conclusões:** Os autores realçam que a avaliação da QV dos doentes pelo pai foi inferior à do respectivo filho. Os doentes e respectivos pais referiram dificuldades com o tratamento e preocupações quanto ao futuro. Os profissionais de saúde deverão atender a estes alertas. O bom controlo metabólico revelou-se importante na QV da amostra estudada.

### PALAVRAS-CHAVE

Crianças; Adolescentes; *Diabetes mellitus* tipo 1; Qualidade de vida.

**ABSTRACT**

*Aim: Evaluate self-report and parent proxy report of child/teen quality of life (QoL) in youth with type 1 diabetes mellitus, compare their responses and identify relationships between QoL and age, sex, socioeconomic status, disease duration, metabolic control, intensive insulin treatment and psychological parameters.*

*Design: transversal.*

*Subjects: 58 children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and their parents participated. Over half (55%) of the patients were male and mean age was 11,9±3,9 years (minimum 3,7; maximum 18 years). Median duration of diabetes was 3,5 years.*

*Methods: Demographic and diabetes-related information were collected from clinical process. Each child/teen and a parent completed the Pediatric Quality of Life Inventory® (PedsQL) 3.0 Diabetes Module. Identification of relationships between clinical and demographic parameters and Results were compared with demographic and diabetes-specific data.*

*Results: Total score of quality of life was 66,1±12,0 and 60,6±14,9, for children/adolescents and parents, respectively. Parents reports showed worse global QoL and greater «problems with treatment» and «diabetes worry» than child/teen individual perception. That last item was the worst. No statistically significant difference between groups nor correlation with gender, age, disease duration, socioeconomic status and intensive treatment. Negative correlation between HbA1c and QoL.*

*Conclusions: Parental perception of the child/teen's QoL is in most cases worse than patient's individual perception. Both child/teen and parents have problems with treatment and worries about their future. Health professionals should help them in order to improve it. Good metabolic control is associated with better QoL.*

**KEYWORDS**

*Children; Adolescents; Type 1 diabetes mellitus; Quality of life.*

**INTRODUÇÃO**

A *diabetes mellitus* (DM) é uma patologia crónica com incidência crescente em idade pediátrica. Como doença, afecta não só o bem-estar físico, mas também psíquico e social. A abordagem e convivência diária com a doença é, de facto, particularmente difícil quer para as crianças e adolescentes quer para os respectivos pais, uma vez que exige uma adaptação multidimensional, incluindo comportamental e psicológica<sup>1</sup>. Os pais parecem sofrer maior impacto emocional perante uma doença crónica e sobreestimar as dificuldades comportamentais dos respectivos filhos. Muitas vezes, o interesse dos profissionais de saúde e pais focaliza-se nos aspectos físicos da DM, esquecen-

do os psicossociais e a importância da melhoria da qualidade de vida (QV) dos doentes.

Recentemente, tem sido reconhecido o papel fundamental da qualidade de vida dos doentes e respectiva família, para além do controlo metabólico, no sucesso terapêutico<sup>1-3</sup>. Investigações internacionais reconhecem a *Pediatric Quality of Life Inventory® (PedsQL) 3.0 Diabetes Module* como um instrumento válido e fiel para medir a QV das crianças e adolescentes dos 2 aos 18 anos<sup>4-7</sup>. Esta escala permite a avaliação clínica da QV relacionada com a saúde dos diabéticos, através da aplicação de questionários adequados às faixas etárias, que se encontram disponíveis para consulta online ([www.pedsq.org](http://www.pedsq.org)). Os autores efectuaram o processo de Validação

Linguística da PedsQL® 3.0 módulo diabetes, atendendo às normas do MAPI RESEARCH TRUST, detentor desta escala. Os questionários contêm 28 itens multidimensionais: sintomas (11), dificuldades com a terapêutica (4) e adesão à mesma (7), preocupações com a doença (3) e comunicação com os profissionais de saúde (3). As respostas são tipo *Likert* e convertidas em pontuação de 0-100, sendo a QV directamente proporcional ao valor<sup>5</sup>.

Os objectivos do presente estudo são: avaliar a QV das crianças e adolescentes (2 aos 18 anos) com DM 1 há pelo menos 6 meses; comparar a pontuação do diabético com a parental e identificar factores associados à QV nestes doentes.

## MÉTODOS

O estudo decorreu na Consulta de Endocrinologia do Serviço de Pediatria do Hospital Santo António, no período de Janeiro a Agosto de 2009. Foram incluídos todos os doentes com *diabetes mellitus* tipo 1, com pelo menos seis meses de duração da doença, sendo excluídos os que apresentavam outras patologias crónicas e se encontravam sob infusão subcutânea contínua de insulina. A validação linguística dos questionários PedsQL® versão 3.0 – módulo diabetes foi obtida pelos autores, segundo as normas do *Mapi Research Institute*. Após informação quanto aos objectivos do estudo e consentimento para o mesmo, foi aplicado o questionário PedsQL® – versão 3.0 – módulo diabetes, aos doentes com idades entre 5 e 18 anos e, separadamente, ao pai/mãe dos respectivos doentes dos 2 aos 18 anos. O preenchimento dos mesmos decorreu de forma pessoal, anónima e confidencial. As respostas em escala tipo *Likert* foram convertidas em pontuação de 0 a 100, sendo a QV tanto maior quanto maior o valor obtido.

Procedeu-se à análise dos parâmetros demográficos e clínicos, por forma a caracte-

terizar a população e interpretar os dados do presente estudo. Os parâmetros avaliados foram: sexo, idade cronológica e ao diagnóstico, tempo de evolução da doença, forma de apresentação, nível socioeconómico (escala de Graffar), regime de insulina em uso, HbA1c média nos últimos 6 meses, índice de massa corporal actual (IMC).

O tratamento estatístico foi efectuado com o programa SPSS®17, tendo incluído 3 etapas. A primeira para análise de frequências, médias, medianas e desvios-padrão das variáveis demográficas e clínicas e da pontuação obtida nos questionários. A segunda para comparação da pontuação obtida pelo doente e respectivo pai, utilizando os testes-t emparelhados. A terceira para correlação dos parâmetros demográficos e clínicos com a pontuação obtida nos questionários (correlação Pearson, chi-quadrado ou teste-t, dependendo da variável estudada). Foi considerada significância estatística para valores de p inferiores a 0,05.

## RESULTADOS

O número total de doentes com DM 1 seguidos na consulta de Endocrinologia Pediátrica é 94. Cerca de 62% (n=58) cumpriram os critérios de inclusão, consentiram a participação no estudo e preencheram os questionários correcta e completamente. A distribuição por sexo foi: 55% do masculino e 45% do feminino. O nível socioeconómico (escala de Graffar adaptada) mais frequente foi o 3 e 4 (91%), sendo os restantes 9% do 5. As médias de idades cronológica e de início da DM foram 11,9±3,9 anos (mínimo 3,7 e máximo 18) e 7,3±4,1 anos (mínimo 0,9 e máximo 16,1), respectivamente. A cetoacidose como forma de apresentação da doença ocorreu em 22% dos casos. A amostra tinha uma duração doença de 5,3±3,7 anos (mínimo 0,6 e máximo 15). Relativamente à HbA1c (DCA 2000) média, dos últimos 6 meses, foi 8,3±1,1% (mínimo 6,1% e máxi-

mo 12,1%). Doze doentes (20,7%) eram obesos e 4 (6,9%) tinham excesso de peso (CDC 2000). Quanto ao regime de tratamento usado, 79% encontrava-se sob esquema de múltiplas administrações diárias de insulina (MADI) e os restantes faziam 2 a 3 administrações de insulinas mistura. Nenhum dos doentes da amostra efectuava infusão subcutânea contínua de insulina.

Nos questionários das crianças e adolescentes, a pontuação média da QV global, numa escala de 0 a 100, foi  $66,1 \pm 12,0$  (mínimo 35, máximo 89). Nos questionários dos pais foi  $60,6 \pm 14,9$  (mínimo 8, máximo 83). Os itens com cotação mais elevada foram: «adesão à terapêutica» e «comunicação com os profissionais de saúde». (Tabela I)

Doentes versus pais, tiveram diferença estatisticamente significativa na QV global, «dificuldades com a terapêutica» e «preocupações com a doença», sendo o último o pior domínio em ambos. Na Tabela I, encontram-se os resultados do teste t - amostras emparelhadas relativamente à QV global e respectivos itens multidimensionais estudados.

TABELA I: Pontuação dos questionários dos doentes e pais

	Doente	Pai/mãe	p
QV global	$66,6 \pm 12,1$	$61,1 \pm 14,8$	$< 0,05$
Sintomas	$66,4 \pm 12,8$	$64,7 \pm 16,2$	$\geq 0,05$
Dificuldade com a terapêutica	$66,9 \pm 20,5$	$58,6 \pm 21,9$	$< 0,05$
Adesão à terapêutica	$79,4 \pm 17,8$	$77,8 \pm 18,1$	$\geq 0,05$
Preocupações com a doença	$44,1 \pm 27,2$	$28,5 \pm 23,7$	$< 0,05$
Comunicação com os profissionais de saúde	$76,2 \pm 23,1$	$75,9 \pm 30,7$	$\geq 0,05$

Dados em média, desvio-padrão; p - nível de significância.

Obteve-se correlação negativa da HbA1c com a QV global ( $r = -0,23$ ,  $p 0,01$ ) e os itens do tratamento ( $r = -0,24$ ,  $p 0,03$ ) e comunicação com os profissionais de saúde ( $r = -0,21$ ,  $p 0,02$ ). Sexo, idades cronológica e de diagnóstico, tempo de evolução, regime de insulina e nível socioeconómico não estiveram relacionados de forma estatisticamente significativa com a QV.

## DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a ser realizado em Portugal. A nível internacional estes estudos têm vindo a expandir-se. Muitas vezes, o interesse dos profissionais de saúde foca-se nos múltiplos aspectos físicos da DM, dando menor relevância aos psicossociais e à qualidade de vida dos doentes e, por efeito indirecto, aos seus cuidadores também. A importância reconhecida dos inquéritos de saúde na monitorização e melhoria dos cuidados prestados, fez os autores optarem por um dos melhores instrumentos na monitorização da qualidade de vida em idade pediátrica, como o Peds QL®, pela sua validade, fidelidade e aplicabilidade reconhecidas.

Na amostra estudada, a qualidade de vida global dos doentes foi muito variável, entre 35 e 89. Dos vários itens avaliados, destacaram-se as «preocupações com a doença» por ter sido o de pior cotação e «adesão à terapêutica» e «comunicação com os profissionais de saúde», por terem sido os melhores. Isto reflecte que o menor sucesso terapêutico está relacionado com: os efeitos psicológicos negativos sentidos, a despreocupação quanto à eficácia do tratamento efectuado no momento pelo próprio e quanto às consequências futuras da doença. Assim, o apoio psicológico, o incentivo e responsabilização do doente no tratamento que efectua, a curto e a longo prazo, são etapas que deverão continuar a ser alvo de preocupação pelos profissionais por forma a alcançar melhor controlo metabólico. De qualquer forma, o cuidado, a disponibilidade e a experiência dos profissionais de saúde em educar e promover o interesse dos doentes, justifica as pontuações obtidas nos itens «adesão à terapêutica» e «comunicação». No entanto, é algo que ainda poderá ser melhorado, em prol do sucesso terapêutico e inerentemente da QV dos doentes e pais. De facto, os estudos internacionais apontam que os itens referidos são fundamentais no controlo metabólico<sup>1-7</sup>.



Comparando a percepção dos doentes e respectivos pais, verificou-se diferença estatisticamente significativa na QV global, «dificuldades com a terapêutica» e «preocupações com a doença». Tal como vem referido em literatura diversa<sup>3,6</sup>, verificou-se um pessimismo parental, talvez relacionado com experiências eventualmente negativas com outros doentes diabéticos na família ou no círculo de amigos e pela melhor percepção da necessidade do rigor em todas as medidas para o melhor controlo metabólico desta doença crónica. Esta preocupação parental repercute-se na QV dos doentes e respectivos pais, deve ser atendida pelos profissionais de saúde, na medida em que será importante promover competências que consigam elevar a auto-estima e segurança dos pais e consequentemente melhorar a QV de todos os implicados. A avaliação da qualidade de vida deverá ser realizada tendo em conta quer as respostas das crianças/adolescentes quer a dos seus pais, uma vez que ambas reflectem diferentes perspectivas, fornecendo informações únicas e importantes. Teria sido interessante conhecer o funcionamento familiar para melhor compreender as diferenças nos resultados dos pais vs filhos.

Ao contrário do que aparece por vezes descrito na literatura, sexo e idade<sup>8</sup>, estatuto socioeconómico<sup>6</sup>, tempo de evolução<sup>2</sup> e regime de insulina<sup>6,8</sup> não estiveram relacionados de forma estatisticamente significativa com a QV. Tal como referido noutra estudo<sup>8,9</sup>, obteve-se correlação negativa da HbA1c com a QV. No entanto, existem estudos em que esta correlação não é clara<sup>5,9</sup>.

Os autores salientam a importância deste tipo de estudos por forma a conhecer a população tratada na consulta e por conseguinte responder às principais dificuldades sentidas pelos doentes e respectivos pais e garantir a melhor saúde possível, isto é, física, psíquica e social. Será útil mais investigação futura nesta área.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. JW Varni (*Department of Pediatrics, College of Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, USA, jvarni@archmail.tamu.edu*) pela sua disponibilidade para se proceder à Validação Linguística do PedsQL versão 3.0 – módulo diabetes. Igualmente se agradece a todas as crianças, adolescentes e respectivos pais que participaram no estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Delamater AM. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-7. Psychological care of children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 340-8.
2. Nardi L et al. Quality of life, psychological adjustment and metabolic control in youth with type 1 diabetes: a study with self- and parent-report questionnaires. *Pediatr Diabetes* 2008; 9:496:523.
3. Emmanouilidou E et al. Quality of life of children and adolescents with diabetes of Northern Greek origin. *Hippokratia* 2008; 12(3): 168-175.
4. Wit M et al. Monitoring health related quality of life in adolescents with diabetes: a review of measures. *Arch Dis Child* 2007; 92:434-9.
5. Varni J et al. The PedsQL in type 1 and type 2 diabetes. Reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory Generic Core Scales and type 1 Diabetes Module. *Diabetes Care* 2003; 26 (3): 631-7.
6. Laffel L et al. General Quality of Life in Youth with type 1 diabetes: relationship to patient management and diabetes-specific family conflict. *Diabetes care* 2003; 26 (11): 3067-72.
7. Wit M et al. Monitoring and discussing Health Related quality of Life in adolescents with type 1 diabetes improves psychological well-being. A randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2008; 31(8): 1251-6
8. Wagner VM e tal. Age, metabolic control and type of insulin regime influences health-related quality of life in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Pediatrics*. 2005; 164 (8): 491-6.
9. Howy H et al. Good metabolic control is associated with better quality of life in 2,101 adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2001; 24 (11); 1923-8.