

**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**A UTILIZAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA DEFINIÇÃO  
HISTOGENÉTICA DIAGNÓSTICA DAS NEOPLASIAS DE PULMÃO**

**ANA MARIA DA SILVA CARVALHO**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2009**





**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia**

**A UTILIZAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NA DEFINIÇÃO  
HISTOGENÉTICA DIAGNÓSTICA DAS NEOPLASIAS DE PULMÃO**

**ANA MARIA DA SILVA CARVALHO**

**Orientador: EDUARDO ANTONIO GONÇALVES RAMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Humana, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia – Brasil  
2009**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Carvalho, Ana Maria da Silva

C331u A utilização da imuno-histoquímica na definição histogenética diagnóstica das neoplasias de pulmão [manuscrito] / Ana Maria da Silva Carvalho. - 2009.  
101 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2009.**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo A. G. Ramos, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.**

1. Câncer do Pulmão. 2. Diagnóstico. 3. Imuno-histoquímica. I.Título.

CDU 616-006.6:616.24

*Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já tem a forma do nosso corpo e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos nossos lugares.*

*É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.*

*Fernando Pessoa*

## **Dedicatória**

**Aos meus amados pais, Armando e Laís, por me permitir à  
experiência da VIDA...**

**Ao meu amor Paulo, pela BELEZA DE SEU CORAÇÃO...**

**A minha doce amada Cecília, fruto de minha VIDA, por sua  
TERNURA, AMOROSIDADE E CORAGEM!**

**Aos meus queridos irmãos Vera e Paulo.  
Obrigada! Grandes seres, companheiros de minha Caminhada.**

# **Agradecimentos Especiais**

**Ao meu orientador PROF. DR. EDUARDO RAMOS, por sua INTEIREZA,  
RETIDÃO e a GRANDEZA DE SEU OLHAR...**

**À Dra MARILDA GONÇALVES, pela SENSIBILIDADE e RESPEITO ao próximo...**

**À Dra CLARISSA GURGEL, minha INSPIRAÇÃO... despertar da  
minha MOTIVAÇÃO!**

**À companheira CRISTINA VASCONCELOS, pelo apoio ininterrupto moral,  
pessoal e amoroso.**

**Aos “companheiros de caminhada” VALDEYER G. REIS e DANIELA  
QUINTELA, que me instigaram a “ousar” e que “vivem” em meu coração!**

# Agradecimentos

***Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização do presente trabalho e particularmente,***

**Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,**

Que cumpre com excelência a função de integrar a ciência enquanto transformadora social

**Ao Hospital Especializado Otávio Mangabeira,** referência para tratamento de doenças respiratórias/ torácicas, no estado da Bahia.

**A Dra Aldina Barrai,**

Pela competência na coordenação da Pós-graduação em Patologia.

**Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia,** especialmente Dra. Marilda Gonçalves, Dr. Edson Moreira, Dr Mitermayer Reis, Dra. Fabíola Cardilho, Dra. Cláudia Brodskyn e Dr Zilton Andrade, pela dedicação a este centro de pesquisas e a pós-graduação em patologia.

**Aos colegas de turma do Mestrado, em especial, Manuela, Magda, Graciomar, Sanara, André, Zé, Marquinhos, Fábio, Jaqueline, Théo e Joelma** pelos excelentes momentos de convivência.

**Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial a Tauar, Taise, Rosangela, Flávia, Sônia,** por facilitarem imensamente as nossas vidas.

**Aos bolsistas de iniciação científica, Renata, Caroline, Leonardo** pela energia jovial que torna mais agradável o nosso ambiente de trabalho.

**À Dra Clara Lima,** por possibilitar sem reservas a continuidade desse trabalho.

**Ao amigo Ariindo,** que me conduzia com paciência depois de tantas esperas ao encontro de minha família.

**A todos os COMPANHEIROS do CPqGM, especialmente a Sonia Guimarães, Valderez, Noilson, Elizabeth, Vanja, Maria, Antônio, Eliana e Ana Fiscina.**

**... e aos que fizeram e fazem parte do meu crescimento pessoal e profissional.**

# SUMÁRIO

---

	Pág
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE QUADROS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 EPIDEMIOLOGIA	22
2.2 ASPECTOS ETIOPATOGÊNICOS	23
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS	26
2.4 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	32
2.4.1 Principais tipos histopatológicos de câncer do pulmão	35
2.4.1.1 Carcinoma não pequenas células	36
2.4.1.2 Carcinoma de pequenas células	40
2.5 MARCADORES DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS DE CÂNCER DO PULMÃO	41
2.5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA	41
2.5.1.1 Marcadores de Diferenciação Epitelial	43
• Citoqueratinas (CKs)	43
2.5.1.2 Marcadores tumorais específicos de diferenciação citoplasmática ou de membrana ou fatores de transcrição nuclear	46
2.5.1.3 Marcadores de Diferenciação Neuroendócrina	48
3 OBJETIVOS	50
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Delineamento da Pesquisa e Casuística	51
4.2 Considerações Éticas	51
4.3 Métodos	51
4.3.1 Avaliação Morfológica	51
4.3.2 Encaminhamento dos casos para a IHQ e definição histogenética	52
4.4 Análise dos Dados	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Casuística	56
5.2 Dados epidemiológicos	57
5.3 Análise Morfológica	58
5.4 Análise Imuno-Histoquímica	61
5.4.1 Imunomarcacão	62
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90

---

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AAH	hiperplasia adenomatosa atípica
ACS	<i>American Cancer Society</i>
ADC	adenocarcinoma.
Ag	Antígeno
Ba	refere-se ao estado da Bahia
BB	biópsia brônquica
BTB	biópsia transbrônquica
°C	unidade de medida de temperatura graus Celsius
CAAC	Comitê da Associação Americana em Câncer
CBA	carcinoma bronquioloalveolar
CCE	carcinoma de células escamosas, carcinoma escamocelular ou epidermóide
CD 56/ NCAM	refere-se ao anticorpo monoclonal anti CD56 humana
CGC	carcinoma de grandes células
CIS	carcinoma "in situ"
CNGC	carcinoma neuroendócrino de grandes células
CP	câncer de pulmão
CPPC	câncer pulmonar de pequenas células
CPNPC	câncer pulmonar não pequenas células
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CK AE1/AE3	refere-se ao anticorpo monoclonal anti citoqueratina AE1/AE3
CK 8	refere-se ao anticorpo monoclonal anti citoqueratina 8
CK 34 $\beta$ E12	refere-se ao anticorpo monoclonal anti citoqueratina 34 $\beta$ E12
CK 5/6	refere-se ao anticorpo monoclonal anti citoqueratina 5/6
CK 20	refere-se ao anticorpo monoclonal anti citoqueratina 20
CK 7	refere-se ao anticorpo monoclonal anti citoqueratina 7
Chromogranin A (Cg A)	refere-se ao anticorpo monoclonal anti cromogranina A
DAB	diaminobenzidina
DIPNECH	hiperplasia difusa neuroendócrina idiopática
DNA	do inglês " <i>desoxyribonucleic acid</i> ", traduzido como ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	ácido clorídrico
H&E	hematoxilina e eosina
HEOM	Hospital Especializado Octávio Mangabeira.
HRP	do inglês, " <i>Horse Raddish Peroxidase</i> "
IHQ	imuno-histoquímica
IARC	<i>International Agency of Research in the Cancer</i>
IASLC	<i>Internacional Association for the Study of Lung Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kD	kilo daltons, unidade de peso molecular
M	presença ou ausência de metástases à distância
M	unidade de concentração molar
ME	microscopia eletrônica

---

MS	Ministério da Saúde
mM	unidade de concentração, milimolar
mL	unidade de medida de volume, mililitros
mol/L	unidade de concentração, mol por litro
N	presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais
N/C	relação núcleo/ citoplasma
NSE	refere-se ao anticorpo monoclonal anti enolase neurônio-específica
OMS	Organização Mundial da Saúde
%	per centagem, unidade de valor percentual
P-450	enzima hidrocarbono-hidroxilase
9,5 PGP	produto proteico do gene 9,5
P450 2A6	citocromo P450 2A6
pH	potencial hidrogênio iônico
p53	refere-se ao anticorpo monoclonal anti proteína p53
PAS	ácido per-iodico de Schiff
PBS	do inglês, " <i>Phosphated buffered solution</i> ", traduzido como solução salina fosfatada
PC	peças cirúrgicas
PM	peso molecular
SH	Serviço de Histopatologia
SPA	refere-se ao anticorpo monoclonal anti apoproteína pulmonar surfactante A
SUS	Sistema Único de Saúde
T	grau de extensão local do tumor primário
TM	<i>Trade mark</i>
TA	temperatura ambiente
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano.
TTF-1	refere-se ao anticorpo monoclonal anti fator de transcrição nuclear da tireóide
UE	União Européia
UICC	União Internacional contra o Câncer
USA	do inglês, " <i>United States of America</i> ", traduzido com Estados Unidos da América
µl	microlitro
µm	micrometro, unidade de medida de comprimento

---

## LISTA DE FIGURAS

---

	Pág
Figura 1: Distribuição dos pacientes por faixa etária.	58
Figura 2: Principais informações clínicas	58
Figura 3: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Maciços de células epiteliais de tamanho médio e grande, atípicas, infiltrando francamente a lâmina própria da mucosa bronquiolar (HE, 100X). (B) Detalhe da foto anterior salientando o padrão pouco diferenciado do tipo celular neoplásico (HE, 400X). (C) Imunomarcção positiva para CK34BE12, multifocal, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (D) Imunomarcção fortemente positiva para CK5/6, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X).	70
Figura 4: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A e B) Maciços irregulares de células neoplásicas epiteliais muito atípicas infiltrando a lâmina própria de mucosa bronquiolar (HE, 400X). (C) Imunomarcção positiva para CKAE1/AE3, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 200X). (D) Imunomarcção positiva para CK7, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (E) Imunomarcção positiva para SPA, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 200X). (F) Imunomarcção positiva para TTF-1, difuso, padrão nuclear (EnVision™, 400X).	71
Figura 5: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Mucosa bronquiolar com metaplasia escamosa do epitélio de revestimento e na lâmina própria, neoplasia infiltrante formada por maciços irregulares de células epiteliais (HE, 200X). (B) Detalhe da foto anterior mostrando atiplas nucleares e a variação do tamanho dos maciços tumorais (HE, 400x). (C) Detalhe do tipo celular neoplásico, salienando-se o citoplasma róseo relativamente evidente (HE, 400X). (D) Imunomarcção positiva para Cromogranina A no citoplasma das células tumorais, padrão granular (EnVision™, 400X).	72
Figura 6: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Mucosa bronquiolar exibindo células tumorais bastante atípicas, de tamanho médio e grande infiltrando a lâmina própria (HE, 400X). (B) Detalhe da foto anterior, salientando-se a atipla celular (HE, 400X). (C) Imunomarcção positiva para CK7, focal, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (D e E) Imunomarcção positiva para CK8, multifocal, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (F) Imunomarcção positiva para Cromogranina, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X).	73

Figura 7: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Mucosa bronquiolar exibindo na lâmina própria, infiltração neoplásica formada por maciços irregulares de células pequenas apresentando artefatos decorrentes de esmagamento tecidual (HE, 200X). (B) Visão panorâmica da neoplasia maligna de células pequenas infiltrando o tecido conjuntivo da mucosa (HE, 100X). (C) Imunomarcação positiva para CKAE1/AE3, multifocal, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (D) Imunomarcação positiva para Cromogranina A, multifocal, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X).

## LISTA DE TABELAS

---

---

	Pág
Tabela 1: Interpretação dos valores de kappa.	52
Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados na pesquisa.	53
Tabela 3: Imunorreatividade dos marcadores formadores do painel imuno-histoquímico.	55
Tabela 4: Total de casos, neoplasias de pulmão e biópsias pulmonares encaminhados ao CPqGM entre 1986 a 2004.	56
Tabela 5: Levantamento de casos de câncer de pulmão do SH/CPqGM/FIOCRUZ, entre 1986-2004.	57
Tabela 6: Subtipos histológicos das neoplasias malignas pulmonares no período de 1986 a 2004, considerando o 1º e o 2º diagnósticos em HE.	59
Tabela 7: Tipos histológicos e graus de diferenciação celular na 1ª e 2ª avaliação em HE.	60
Tabela 8: Frequência de discordância entre primeira e segunda análise, segundo os grupos tumorais.	61
Tabela 9: Variação interobservador da análise histológica em HE (1ª análise e 2ª análise).	61
Tabela 10: Frequência das suspeitas diagnósticas de todos os tumores encaminhados à análise através de IHQ, após a 2ª avaliação em HE.	62

---

---

<b>Tabela 11: Freqüência de positividade dos marcadores imuno-histoquímicos e subtipos histológicos das neoplasias de pulmão, estudadas em BB e BTB.</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 12: Freqüência dos subtipos histológicos das neoplasias após análise imuno-histoquímica, confrontando com as suspeitas diagnósticas.</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 13: Modificação do diagnóstico entre a análise histológica e análise através da IHQ, de câncer de pulmão.</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 14: Variação entre a análise baseada na histologia e a análise histológica associada a IHQ no total de casos estudados.</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 15: Subtipos histológicos das neoplasias malignas pulmonares no período de 1986 a 2004, considerando o 1º e 2º diagnósticos em HE e a análise HE+IHQ.</b>	<b>69</b>

---

## LISTA DE QUADROS

---

---

	Pág
Quadro 1: Classificação de Tumores. Patologia e Genética de Tumores de Pulmão, Pleura, Timo e Coração (OMS, 2004), forma simplificada.	35
Quadro 2. Modificação no Diagnóstico após IHQ .	67

---

## RESUMO

O Câncer de Pulmão (CP) é uma neoplasia de grande prevalência no mundo e apresenta taxas crescentes de incidência. Acomete principalmente homens entre 40 a 70 anos, sendo responsável por 1/3 dos óbitos por câncer. Os fatores etiológicos frequentemente associados a esta patologia são o tabagismo, as exposições industriais ao asbesto, urânio, níquel, arsênico, assim como poluentes atmosféricos como o gás radônio. Representa um grande desafio para os oncologistas, especialmente pela pequena taxa de sobrevivência dos pacientes, em torno de 5 a 10% após 5 anos do diagnóstico. A complexidade de padrões morfológicos e pouca diferenciação representam desafios para o diagnóstico do CP. Dentre as estratégias introduzidas para auxiliar no reconhecimento dos tipos histológicos do CP, a imunohistoquímica (IHQ) vem se destacando no estudo histogenético destes tumores. O objetivo dessa pesquisa foi o estudo retrospectivo de 244 casos de CP, procedentes do Hospital Especializado Otávio Mangabeira, diagnosticados em biópsias brônquica e transbrônquica no Serviço de Histopatologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, no período compreendido entre 1986 e 2004. Todos os casos foram revisados de acordo com a classificação de câncer de pulmão da OMS (2004), sendo os diagnósticos da presente investigação confrontados com os diagnósticos iniciais. Os tumores definidos como carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados (n=67) e as neoplasias definidas como casos difíceis para a avaliação diagnóstica pelo HE (n=34) (divergência diagnóstica), foram submetidos a IHQ. Esta foi realizada através do sistema Envision™ e utilizando o seguinte painel mínimo de marcadores antigênicos: CKAE1/AE3, CK8, CK34BE12, CK7, CK20, SPA, CROMOGRANINA A e TTF-1. A frequência dos diferentes tipos neoplásicos nos 244 casos analisados foi: carcinoma escamocelular, 36,9% (n=90); adenocarcinoma, 27,0% (n=66); carcinoma neuroendócrino de pequenas células, 11,9% (n=29); tumor carcinóide, 8,6% (n=21); linfoma/sarcoma, 2,4% (n=6); carcinoma neuroendócrino de grandes células, 0,4% (n=1); carcinoma adenoescamoso, 0,4% (n=1), permaneceram com o diagnóstico de carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, 5,7% (n=14) dos casos e 2,4% (n=6) continuaram como neoplasia maligna indiferenciada. A IHQ definiu histogeneticamente 93,1% (n=94) dos casos examinados e 6,9% (n=7) deixaram de ser avaliados por ausência de tecido tumoral nas seções (exigüidade de material). A modificação do diagnóstico entre a análise histológica e análise dos 101 casos através da IHQ, apresentou uma concordância negativa de 71,3% e concordância positiva de 28,7%. A avaliação geral de todos os tumores (244 casos) na 1ª análise (HE) e as neoplasias classificadas na 2ª análise em HE+IHQ resultaram em uma concordância negativa de 27,5% e concordância positiva de 72,5%. Concluímos que a IHQ é um bom método complementar para o diagnóstico de câncer de pulmão; o painel mínimo de marcadores antigênicos utilizados foi capaz de definir histogeneticamente 93,1% dos casos submetidos à IHQ; o diagnóstico preciso e rigoroso do câncer de pulmão não prescinde do exame convencional em HE para a escolha dos marcadores antigênicos a serem utilizados na interpretação diagnóstica final.

**Palavras chave:** câncer de pulmão; diagnóstico; imunohistoquímica; definição histogenética tumoral.

## **Abstract**

Lung cancer (LC) is one of the neoplasias mostly prevalent worldwide and it shows increasing rates of incidence. It attacks mainly men between the ages of 40 and 70, and it has been responsible for 1/3 of all deaths caused by cancer. The most important etiological factors associated with this kind of pathology are cigarette smoking and industrial expositions to asbestos, uranium, nickel, arsenic and atmospheric pollutants as radon gas. It presents a great challenge for oncologists, especially due to the low five years survival rate after diagnosis. Complex morphological patterns and also lack of differentiation in many cases poses as difficulties for the diagnosis of LC. Among the strategies introduced to help the recognition of different histological types of LC, the immunohistochemistry (IHC) appears as one of the most important methods in the histological diagnosis of these tumors. The main objective of this research was to perform a retrospective study of 244 cases of LC, coming from the Otavio Mangabeira Thoracic Hospital through the analysis of bronchial and transbronchial biopsies during the period of 1986-2004, at the Histopathological Service, Gonçalo Moniz Research Center. All of the cases were revised according to the LC classification of WHO (2004) and the diagnosis of this investigation were confronted with the first ones that are present in our files. The criteria for sending the cases for IHC were tumors defined as indifferiated/poorly differentiated cases (n=67) and the ones considered as difficult cases for evaluation on HE stain only (divergent diagnosis, n=34). The immunohistochemical study was done using the Envision system™ and making use of the followings antigenic markers: CKAE1/AE3, CK8, CK34BE12, CK7, CK20, SPA CHROMOGRANIN A and TTF-1. The frequency of the different neoplastic types in the 244 analysed cases were: squamous cell carcinoma, 36,9% (n=90); adenocarcinoma, 27% (n=66); small cells neuroendocrine carcinoma, 11,9% (n=29) carcinoid tumor, 8,6% (n=21); linfomas/sarcomas, 2,4% (n=6); large cell neuroendocrine carcinoma, 0,4% (n=1); adenosquamous carcinoma, 0,4% (n=1). 5,7% of the tumors (n=14) remained as non-small poorly differentiated cell carcinoma and 0,8% of cases (n=2) remained as indifferiated malignant tumor. The IHC was able to histogenetically define 93,1% (n=94) of the cases analysed by this technique and 6,9% (n=7) could not be evaluated due the lack of tumoral material on the slides. The diagnosis change between the HE stain and the IHC analysis of the 101 cases showed a negative concordance of 71,3% and a positive concordance of 28,7%. The evaluation of all 244 cases comparing the first analysis in HE stain and the second one including HE + IHC disclosed a positive concordance of 72,5% and a negative one of 27,5%. We concluded that the IHC is a good auxiliary method for the LC diagnosis; the minimum set of antigenic markers used in this study was to precisely define the histogenesis of 93,1% of the cases evaluated by IHC; the precise e rigorous diagnosis of LC can not rule out the conventional HE stain exam in order to select the main diagnosis possibilities and than choose the antigenic markers to be used in the final diagnostic conclusion.

**Keywords:** Lung cancer; diagnosis; immunohistochemistry; tumoral histogenetic definition.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XIX até as primeiras décadas do século XX, o câncer de pulmão (CP) era considerado como uma entidade rara. Acontece que sua incidência vem aumentando de tal forma que hoje, esse aumento é de 3% ao ano, sendo então considerado como a neoplasia maligna visceral de maior prevalência e mortalidade no mundo. Acomete ambos sexos entre 40 e os 70 anos de idade principalmente, é a primeira causa de morte por neoplasias malignas no sexo masculino em muitos países industrializados. A ocorrência entre as mulheres é crescente, tornando-se inclusive um problema de saúde pública, ultrapassando o carcinoma de mama como principal causa de morte, aproximando-se da ocorrência em homens, apresentando taxas crescentes de incidência e prevalência, representando 13% dos novos casos anuais de câncer em todo o mundo, correspondendo à cerca de um milhão de novos diagnósticos (LANDIS et al., 1998; COTRAN et al., 2000; ZAMBONI, 2002; SASCO, 2003; SOTTO MAYOR, 2006).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) foi estimado para o ano de 2008, no Brasil, 17.810 novos casos de CP em homens e 9.460 casos em mulheres. Esses valores correspondem a um risco próximo de 19/100.000 nos homens e 10/100.000 nas mulheres, sem considerar os tumores de pele não melanoma. No Brasil, o câncer de pulmão em homens, é o terceiro mais freqüente nas regiões Nordeste (9/100.000) e Norte (8/100.000), enquanto que em mulheres, é o quinto mais freqüente na região Nordeste (5/100.000).

Flanders et al. (2003) enfatizaram uma associação estatística entre a freqüência de câncer de pulmão, quantidade diária de consumo de cigarros, duração do hábito e forma de utilizar o tabaco. Outros carcinógenos químicos estão associados à ocorrência do CP como as exposições industriais ao asbesto, urânio, níquel, cromatos, carvão, gás mostarda, arsênico, berílio, ferro; outros poluentes atmosféricos podem se tornar importantes, no aumento da incidência e prevalência deste câncer, principalmente o radônio (WITHROW et al., 2003; PINKERTON et al., 2004).

A neoplasia pulmonar geralmente é assintomática durante sua evolução, embora, uma grande parte dos pacientes apresenta manifestações clínicas,

provenientes do tumor no momento do diagnóstico, de forma que, a doença já se encontra avançada e com poucas opções de tratamento (ZAMBONI, 2002).

Diversos tumores benignos e malignos podem acometer o pulmão, destes, 90 a 95% são carcinomas broncogênicos e os demais são neoplasias mesoteliais e mesenquimais entre outros (COTRAN et al., 2000). O carcinoma broncogênico tem se tornado um grande desafio para os oncologistas, especialmente pela pequena taxa de sobrevivência dos pacientes, em torno de 5 a 10% após 5 anos, mesmo com os avanços tecnológicos e terapêuticos (GINSBERG et al., 1997).

Para Marson et al. (2002) mais de 90% dos carcinomas de pulmão estão compreendidos em adenocarcinomas (30-40%), carcinomas escamocelulares (30%), carcinomas de pequenas células (20-25%) e carcinomas de grandes células (10-20%).

Alguns autores têm demonstrado existir associação entre o tipo histológico do CP, comportamento clínico, indicação terapêutica e prognóstico. Capelozzi (2001), por exemplo, demonstrou que o tratamento cirúrgico para o carcinoma de pequenas células tem um prognóstico desfavorável devido a grande disseminação das células tumorais deste tipo histológico. Desta forma, a classificação do tipo histológico do CP tornou-se fundamental para auxiliar o protocolo terapêutico, bem como, contribuir para o conhecimento da evolução clínica destes tumores, incluindo suas complicações.

O diagnóstico dos tipos comuns de carcinomas de pulmão, geralmente, não é difícil, exceção feita aos tumores poucos diferenciados. A classificação é essencialmente baseada em critérios histológicos definidos pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS).

A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), modificada em 2004, é utilizada atualmente para o câncer de pulmão e é baseada em seu aspecto histopatológico de forma que, o carcinoma broncogênico derivado predominantemente do epitélio brônquico, pode ser classificado em adenocarcinoma, carcinoma de grandes células, carcinoma de pequenas células,

carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, tumor carcinóide e carcinoma com elementos pleomórficos e sarcomatóides (OMS, 2004).

O objetivo dos sistemas classificatórios é permitir o estabelecimento de diagnósticos consistentes entre os patologistas, a partir da análise microscópica, já que parte das dificuldades em diagnosticar com exatidão carcinomas de pulmão, em uma das sete categorias, mais importantes, vem das combinações de padrões morfológicos de muitos tumores (ALBERTI et al., 1986) e da complexa morfologia pulmonar que nem sempre permite a identificação do tipo histológico tumoral, através do exame histopatológico convencional (CAREY, 1994). Rogli et al. (1985), em um estudo de 100 casos de câncer de pulmão obtidos de biópsia excisional, observaram que em apenas 34% das lesões avaliadas, um único tipo celular foi identificado.

Na tentativa de estabelecer critérios mais específicos no reconhecimento dos tipos celulares do CP, foram lançadas estratégias tecnológicas como a microscopia eletrônica (ME) e a imuno-histoquímica (IHQ). Entretanto, dificuldades técnicas e custos operacionais limitam a ampla utilização destas metodologias na identificação histogenética do CP, na rotina diagnóstica.

A imuno-histoquímica representa uma poderosa ferramenta diagnóstica em tumores pulmonares, na detecção de marcadores epiteliais, mesenquimais, linfóides, melanocíticos, neuroendócrinos hormonais e moleculares, permitindo freqüentemente, a definição histogenética tumoral (TRAVIS et al., 1999, CAPELOZZI, 2001).

Embora o exame anatomopatológico de biópsias e a citopatologia do escarro sejam suficientes para diagnosticar câncer de pulmão, as dificuldades são freqüentes, especialmente no que diz respeito ao diagnóstico diferencial. Com o advento da imuno-histoquímica tem-se agora um método diagnóstico avançado e que pode, através da pesquisa de marcadores tumorais diversos, permitir um diagnóstico histogenético preciso da neoplasia pulmonar, contribuindo para uma melhor avaliação e tratamento desta patologia.

Assim sendo, a avaliação retrospectiva de neoplasias pulmonares diagnosticadas, através do exame anatomopatológico convencional e utilizando a imuno-histoquímica, poderá trazer importantes informações sobre o câncer de pulmão, a exemplo dos tipos histológicos mais freqüentes, especialmente no Estado da Bahia. Ao mesmo tempo, informações clínicas recuperadas de prontuários dos pacientes do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), incluídos na amostra deste estudo, poderá contribuir para estabelecer o perfil epidemiológico da população acometida por câncer de pulmão no Estado da Bahia, possibilitando identificar e associar possíveis aspectos etiológicos, relacionados a cada tipo histológico dos CP, em nosso estado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia

O Câncer ou carcinoma pulmonar (CP) é uma neoplasia maligna de grande prevalência, sendo a principal causa de morte por câncer em ambos os sexos (Uehara et al., 2001; Brambrilia, 2002; Santos, 2005), a 3ª mais comum em mulheres, depois do cólon e câncer de mama (SANTOS et al., 2005). Acomete cerca de 1,2 milhões de pacientes/ano (Ahmedin et al., 2007) e representa cerca de 5% das mortes em geral (UEHARA et al., 2001).

Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 22.4 milhões de pessoas estariam vivendo com câncer, 10 milhões de novos casos seriam diagnosticados, dentre os quais, 53% aconteceriam nos países em desenvolvimento e 6,2 milhões de óbitos ocorreriam em todo mundo decorrentes de neoplasias malignas ou suas complicações, o que reflete o aumento de aproximadamente 23% nas taxas de incidência e mortalidade em relação a um estudo similar realizado na década de 90 (PARKIN et al., 2001).

A *American Cancer Society* (ACS) estimou que mais de 1,4 milhões de novos casos de câncer seriam diagnosticados em 2006 nos Estados Unidos, e mais de 564.000 americanos iriam morrer de câncer. Apesar dos esforços visando essencialmente à detecção precoce e tratamento do câncer do pulmão, sua elevada taxa de mortalidade tem persistido por várias décadas. As taxas de mortalidade do câncer de pulmão entre os homens diminuiram 1,3% por ano no período de 1990 a 1994 e 2,0% por ano entre 1994 e 2004.

Apesar de ainda elevada, a prevalência de CP tem diminuído e, segundo os autores supracitados, devido à diminuição do consumo de cigarros nos últimos 30 anos (PARKIN, 2005; JEMAL et al., 2008)

Em mulheres e jovens, entretanto, apesar de já ter sido considerado pouco freqüente, em cinco décadas houve um aumento de 550%. Nestes grupos (Gigliott et al., 1999; Uehara et al., 2000), o aumento do consumo de tabaco e o fumo passivo

são considerados fatores preponderantes. Apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos, o CP permanece como uma doença altamente letal, apresentando uma taxa de sobrevivência global em torno de cinco anos (BECKLES et al., 2003; SILVA JR, 2006).

Cayuela et al. (2008) apontaram que, as taxas de mortalidade por câncer do pulmão entre as mulheres da União Européia (UE) com idade compreendida entre 20 a 44 anos, depois de crescer em 2,8% entre 1970 a 1991, começaram a cair em 3,6%. Isto significa que medidas eficazes podem ser tomadas para reduzir o número de mulheres que fumam, de forma que a epidemia do câncer do pulmão na UE poderia ser colocada sob controle e não atingiria os níveis observados nos EUA.

No Brasil, a sua incidência é de mais de 25 mil pacientes/ano, com um risco estimado de 19/100.000 nos homens e 10/100.000 nas mulheres. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2008), o CP ocorreu em 17.810 homens e 9.460 mulheres. Guimarães (2007) demonstrou que a taxa de mortalidade entre os homens aumentou de 10,64 para 13,07 óbitos/100.000 e em mulheres, de 3,04 para 5,37 óbitos/100.000 entre os anos de 1979 e 2004.

Considerando-se as regiões do país, em homens, o CP é o segundo mais freqüente nas regiões Sul (36/100.000), Sudeste (22/100.000) e Centro-Oeste (16/100.000) e o terceiro nas regiões Nordeste (9/100.000) e Norte (8/100.000). Para as mulheres, é o quarto mais freqüente nas regiões Sul (16/100.000), Sudeste (11/100.000), Centro-Oeste (9/100.000) e Norte (5/100.000), e o quinto mais freqüente na região Nordeste (5/100.000) (INCA, 2008).

## **2.2 Aspectos etiopatogênicos**

Durante a evolução biológica, as mudanças promovidas pela quebra dos mecanismos de defesas, principalmente as que ocorrem via organização histoanatômica, podem levar à maior susceptibilidade no processo de carcinogênese pulmonar, sendo resultado da ação dos agentes mutagênicos que modificam as estruturas ou expressões de determinados genes que regulam a proliferação, a diferenciação e a morte celular (FONG et al., 2003).

Estas alterações possibilitam a reprodução de clones de células que podem dar origem ao desenvolvimento de neoplasias, de forma que, a carcinogênese começa com a exposição do epitélio a um agente agressor, resultando em dano genético, usualmente associado à lesão celular crônica.

As alterações mutagênicas e não mutagênicas ou epigenéticas na célula favorecem a alterações morfológicas, levando a transformação metaplásica do epitélio cilíndrico ciliado e mucoso em epitélio mais resistente, conseqüentemente, em se tratando do aparelho respiratório, levando ao impedimento da aderência de material particulado ao muco e dificuldade na sua eliminação. Este material particulado retido expõe o epitélio respiratório à ação carcinogênica. Ao persistir o estímulo, o epitélio que sofreu a metaplasia pode adquirir então, características de imaturidade (displasia) e uma maior agressividade, podendo ocorrer a transformação em carcinoma *"in situ"* e posterior invasão estromal, possibilitando a origem do carcinoma, especialmente o de células escamosas e do carcinoma de pequenas células (KERR, 2001; FONG et al., 2003; MIRANDA et al., 2003, WANG et al., 2006).

A associação entre o tabagismo e o câncer de pulmão já é bem estabelecida. Shopland (1995) ressaltou que, nos Estados Unidos, a mortalidade por este tipo de câncer obedece a um padrão comportamental em relação ao tabagismo e exposição à fumaça. O risco para desenvolver CP aumenta com doses crescentes de fumo, quantidade da inalação, teor de alcatrão e a qualidade do fabricante de cigarros (GOMES, 2002; SOTTO-MAYOR, 2006; NAVARRO, 2007).

Flanders et al. (2003) constataram uma associação estatística entre frequência de CP e quantidade diária de consumo de cigarros, duração do hábito, precocidade, grau de inalação do tabaco e do conteúdo de nicotina, de forma que o risco diminui em proporção direta, ao número de anos de abandono do hábito de fumar.

Alberg et al. (2007) relataram sobre o estudo clássico de coorte de Hirayama (1981), realizado pelo Instituto de Pesquisa do Centro Nacional do Câncer em Tóquio, que a mortalidade por carcinoma broncogênico em mulheres não fumantes, casadas com homens fumantes foi quase o dobro daquelas em que os maridos eram

não fumantes. Ao mesmo tempo, Wunsch-Filho et al. (2002), em um estudo de caso controle, mostraram o risco elevado de câncer de pulmão entre as pessoas com histórico familiar para este tipo de tumor. Quando fumantes e com antecedentes familiares, estes autores relataram um risco de 2 a 3 vezes maior de desenvolver CP que indivíduos que só fumavam.

A *International Agency of Research in the Câncer* (IARC), em 1979 estimou que os carcinógenos e promotores tumorais inalados da fumaça do cigarro, são responsáveis por cerca de 90% dos casos de câncer de pulmão em homens e por cerca de 78% dos casos em mulheres. Mais de 4000 compostos químicos ativos estão presentes na fumaça do cigarro e, dentre esses, mais de 43 carcinógenos foram identificados, a exemplo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (3,4-benzopireno, metilfenantreno, entre outros), as aminas aromáticas e as nitrosaminas. Esses hidrocarbonetos são considerados os de maior poder carcinogênico, produzindo alterações no genoma, durante sua metabolização via enzima hidrocarbono-hidroxilase-P450. A metabolização desses produtos ocorre principalmente no fígado, podendo também ocorrer nos pulmões e rins e dão origem a dióis-epóxidos, produtos intermediários altamente lesivos para o DNA. A exemplo da nicotina, cerca de 70%, é metabolizada em cotinina, sendo o citocromo P450 2A6 responsável por 90% desta conversão. Essas substâncias provocam mutações e alterações na expressão dos genes, ativando os oncogenes, os responsáveis pelo desenvolvimento do câncer e anulando os anti-oncogenes, os supressores tumorais (MOREIRA et al., 2001; ALBERG et al., 2007).

De acordo com Peiúzio et al. (2006) e Pankiewicz et al. (2007), a longa exposição do epitélio das vias aéreas a diferentes agentes carcinógenos do fumo pode levar a lesões pré-invasivas em 90-95% dos pacientes, as quais podem ser reversíveis com a suspensão do hábito de fumar. Dacic (2008), em um estudo com tecidos obtidos de broncoscopia e biópsias de pacientes com displasia brônquica, demonstrou que cerca de 25% das lesões displásicas progrediu para carcinoma invasivo em um período médio de 36 meses e 50% dos carcinomas *“in situ”* progrediram para carcinoma invasivo em um tempo médio de 30 meses.

Outros agentes carcinógenos já descritos são o asbesto, o arsênico, berílio, bis (clorometil) éter, cádmio, cloreto de vinil, cromo VI, níquel, radônio, sílica, carvão,

fuligem e vapor de ácidos fortes contendo ácido sulfúrico (UEHARA et al., 2000; MIRANDA et al., 2003; ZAMBONI, 2004; PINKERTON et al., 2004).

Kerr (2001); Zamboni (2002); Withrow et al. (2003) demonstraram que os poluentes atmosféricos, também podem desempenhar algum papel no aumento da incidência e prevalência deste câncer, principalmente o radônio, um gás radioativo derivado da degradação de urânio, presente no interior de solo e rochas. Esta substância é um risco potencial à saúde dos trabalhadores de minas de urânio.

A exposição ocupacional a determinados elementos químicos como a sílica, presentes nos processos de extração e beneficiamento de rochas e pedras, na mineração de ouro e pedras preciosas, conduzem os trabalhadores a silicose, doença que predispõe o desenvolvimento de câncer de pulmão (risco relativo aproximado de 4) (ZAMBONI, 2002; BARBOZA et al., 2008).

### **2.3 Aspectos clínicos**

De acordo com Porta et al. (1986) os sintomas respiratórios no câncer de pulmão, têm uma grande repercussão na qualidade de vida dos doentes.

Geralmente, os sintomas iniciais são inespecíficos, como a tosse, a hemoptise e se devem ao crescimento intrabronquial do tumor, outros, refletem a invasão dos espaços e de estruturas adjacentes ao pulmão como mediastino (disfonia, síndrome da veia cava). Os tumores de localização central provocam sinais como tosse, sibilos, estridores (roncos), hemoptise, dispnéia e sintomas como dor torácica, causados por obstrução endobronquial. Já os tumores de localização periférica, em geral são assintomáticos.

Dos efeitos locais, a tosse é o mais comum (45 a 75%). No carcinoma bronquioloalveolar, por exemplo, pode ocorrer com grandes volumes de secreção mucóide. Em seguida contamos com a hemoptise cuja incidência está entre 27 a 57%. A dor torácica está presente em 27 a 49% dos casos de neoplasia de pulmão, é freqüentemente intermitente e do lado do tumor. A dispnéia está presente em aproximadamente 37% da população com CP, provocada por obstrução de grandes

vias aéreas, intrínseca e extrínseca. Em 18% dos pacientes, ocorre rouquidão como primeiro sinal, principalmente por paralisia da corda vocal esquerda, devido à localização e trajeto do nervo laríngeo-recorrente esquerdo. Em torno de 7% dos pacientes com câncer de pulmão exibem derrame pleural neoplásico, que são exudatos sero-sanguinolentos, comumente, associados com adenocarcinomas. Outras causas de derrames pleurais em pacientes com neoplasia de pulmão são devidas a metástases, obstrução linfática, pneumonite pós-obstrutiva ou atelectasia e infarto pulmonar (MOREIRA et al., 1997).

Associadas a sinais e sintomas específicos, encontramos as síndromes de: Pancoast-Tobias, que ocorre nos casos de tumor dos lobos superiores, caracterizada por dor, sendo mais freqüentes em carcinomas não pequenas células, especialmente do tipo escamoso e que exibem crescimento lento. A síndrome de Claude Bernard Horner coexiste com a síndrome de Pancoast, se apresenta com destruição óssea e a atrofia de músculos da mão. A síndrome da compressão da Veia Cava Superior (SVCS), pode ser causada pelo tumor primário ou pelas adenomegalias, favorece a obstrução do fluxo sangüíneo na veia cava superior.

### **2.3.1 Diagnóstico clínico**

O carcinoma broncogênico tem se tornado um grande desafio para os oncologistas, especialmente pela pequena taxa de sobrevida dos pacientes, em torno de 5 a 10% após 5 anos, o que se deve ao fato da evolução da doença ser lenta e assintomática e levar ao diagnóstico tardio, mesmo com os avanços tecnológicos e terapêuticos. Em relação às outras neoplasias, tem havido relativamente poucas mudanças na sobrevida, a despeito da intensa investigação na detecção precoce e de novos métodos de radioterapia, cirurgia e novas drogas quimioterápicas (GINSBERG et al., 1997; UEHARA et al., 1998, UEHARA et al., 2000).

Para Moreira et al. (1997) a maior parte dos diagnósticos de carcinoma brônquico acontece quando a doença se encontra avançada localmente ou já disseminada, uma vez que tumores iniciais não costumam produzir sinais/ sintomas que justifiquem a investigação mais específica, de forma que, mais de 90% dos

doentes com câncer do pulmão, são sintomáticos no momento do diagnóstico e a presença de sintomas evidencia um mau prognóstico.

O diagnóstico tecidual de neoplasias pulmonares malignas é essencial para determinar o tipo histológico e estadiamento do paciente, fatores estes que guiam o tratamento adequado. Outros estados clínicos como as doenças cardiovasculares, pulmonares, hematológicas, além de perda de peso e fatores relacionados ao tumor como a localização, invasão nos órgãos, nódulos ou extensão da doença influenciam sobremaneira a escolha terapêutica (ZAMBONI, 1998; KOMAKI, 1998).

Grande número de pacientes se apresenta ao médico em estágio avançado da doença e apenas entre 15 a 20% dos pacientes com carcinoma brônquico têm doença localizada. Em aproximadamente 25% dos casos, a neoplasia se encontra também nos linfonodos regionais e, em 55% ou mais, o tumor já se apresenta com metástases à distância (CAPELOZZI, 1998; CAPELOZZI, 2001; CAPELOZZI, 2005).

Diversas estratégias têm sido discutidas e utilizadas para identificar precocemente o câncer de pulmão, a exemplo dos estudos “*screening*”, realizados em populações de alto risco para este tipo de câncer, como fumantes e em trabalhadores submetidos à exposição ocupacional de determinadas substâncias (KAZEROONI, 2005).

Os resultados destes programas de triagem para detecção precoce do CP são controversos na literatura. Os primeiros dados da década de 70, utilizando o exame citopatológico do escarro e a radiografia do tórax, não mostraram resultados satisfatórios. Recentemente na década de 2000, alguns trabalhos japoneses mostraram melhores resultados, mas mesmo assim, não definitivos. Atualmente novos estudos estão sendo feitos usando a tomografia computadorizada como ferramenta diagnóstica, mas os resultados estão ainda sendo publicados e submetidos à apreciação geral.

Segundo Fernandez et al. (2002) a classificação do estadiamento clínico, universalmente aceita e adaptável a quase todos os tumores sólidos, é a recomendada pela União Internacional contra o Câncer (UICC) e pelo Comitê da

Associação Americana em Câncer (CAAC). Esta classificação foi criada por Denoix em 1946 e suas regras foram reconhecidas para o câncer do pulmão.

Recomendada para descrever a extensão anatômica da doença, o estadiamento se baseia em algumas características específicas do tumor, como a posição do tumor primário, o tamanho e o grau de extensão local do tumor primário (T), presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais comprometidos (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M), que por conta do avanço tecnológico dos métodos de diagnóstico, são importantes para orientar o tratamento e estimar o prognóstico. Esse sistema de estadiamento clínico-patológico é conhecido como TNM.

Trigueros et al. (2007) salientaram que a sobrevivência global dos pacientes com carcinoma broncogênico, não mudou de forma substancial, apesar dos avanços da medicina e da inclusão de novos tratamentos nestas três últimas décadas. É muito importante o diagnóstico precoce, uma vez que o índice de mortalidade é devido ao fato da maioria dos casos ser diagnosticado em estado avançado de desenvolvimento e disseminação tumorais (PANKIEWICZ et al., 2007).

### **2.3.2 Técnicas diagnósticas usuais**

O Câncer do pulmão é reconhecido por apresentar um comportamento variável devido aos seus diversos tipos histológicos, de forma que, torna-se fundamental conhecer o tipo morfológico e a extensão anatômica da doença para indicar o tratamento adequado e prever o prognóstico de cada caso (FERNANDEZ et al., 2002).

Gledhil et al. (1997); Fernandez, Jatene, Zamboni et al. (2002) apresentaram como os métodos mais utilizados para o diagnóstico do câncer do pulmão, exames radiológicos, a citologia do escarro, a broncoscopia, a punção aspirativa transtorácica e a toracoscopia com biópsia, entre outros.

#### **2.3.2.1 Radiografia de Tórax**

Barros et al. (2006), descreveram que a suspeita da doença é dado, na maioria dos casos, pela radiografia de tórax, o qual é considerado um exame de fácil execução e de custo relativamente baixo. Embora a sua baixa resolução dificulte a detecção de alterações mínimas e precoces, para tumores maiores a sensibilidade está em torno de 70% e especificidade em torno de 90%. É imprescindível para seleccionar, o procedimento mais adequado de obtenção de amostra citohistológica como: a broncoscopia com biópsia brônquica (BB) ou biópsia transbrônquica (BTB)

### 2.3.2.2. Tomografia computadorizada - TC

É o método mais usado no diagnóstico por imagem do câncer de pulmão. Permite a detecção de lesões pulmonares, sua localização, extensão e progressão. Indicado para o estudo inicial, bem como para controlar a evolução e a presença de alterações das lesões (tamanho e volume). Utiliza-se contraste iodado endovenoso, para diferenciar as lesões benignas e malignas. A sensibilidade do método é de 98% e a especificidade de 58%. O valor preditivo positivo é de 68% e o negativo de 96% (SHURE e ASTARITA, 1983; GASPARINI, 1997).

### 2.3.2.3 Citologia do escarro

É o único método de diagnóstico não invasivo disponível para confirmar o diagnóstico de câncer de pulmão e está indicada para os casos onde há contra indicações para a broncoscopia, a exemplo de hipoxemia, o sangramento, a instabilidade cardiovascular (GLEDHIL et al., 1997; FERNANDEZ et al., 2002).

Já em 1971, Oswald et al. relataram que em aproximadamente 40% dos pacientes portadores de câncer do pulmão, uma única amostra de escarro poderia apresentar positividade e que este número aumenta para 56%, 69% e 85%, dos pacientes nas 2<sup>as</sup> 3<sup>as</sup> e 4<sup>as</sup> amostras, respectivamente.

Frost et al. (1984) relataram, que a eficiência da citologia do escarro é influenciado pela localização, tamanho e tipo histológico do tumor. Os melhores resultados, com sensibilidade em torno de 70%, são obtidos quando os tumores são

grandes e centrais como os carcinomas escamosos, representados na maioria das neoplasias pulmonares.

#### 2.3.2.4 Broncoscopia

De acordo com Zamboni (2001) e Soler et al. (2004) é o principal exame na avaliação diagnóstica e estadiamento de pacientes com CP e, segundo estes autores, a técnica é de fácil realização, seguro e com boa tolerância pelos pacientes e fornece informações sobre a localização do tumor. (LORENZONI, 2001; BUGALHO, 2008).

Através desta técnica, é possível obter espécimes de biópsias brônquicas, biópsias transbrônquicas, quando as lesões estão localizadas além da vista do endoscopista e material para citologia (MONTEIRO, 1995; ZAMBONI, 2001; ZAMBONI, 2004; BUGALHO, 2008).

#### 2.3.2.5 Punção-biópsia percutânea com agulha fina (PAAF)

A PAAF foi descrita pela primeira vez em 1883 como um método para o diagnóstico das pneumonias e, em 1886, utilizada para auxiliar o diagnóstico de tumores pulmonares (Fernandez, Jatene, Zamboni et al., 2002). O desenvolvimento de agulhas finas, intensificador de imagens e técnicas citológicas diminuiu os riscos de pneumotórax e, atualmente é considerado por alguns, o procedimento de escolha para tumores periféricos dos pulmões (ZAMBONI et al., 2003; ZAMBONI, 2004).

A sensibilidade desta técnica varia de 70 a 100%, depende da localização e do tamanho da lesão, sendo maior nos tumores maiores que 3 cm. Dentre as contra-indicações para a PAAF estão tosse incontrolável, lesão central e o risco aumentado de hemorragia pós punção (CARAZZAI et al., 2006).

#### 2.3.2.6 Biópsia aspirativa por agulha grossa ou PAG ou *core needle biopsy*

Esta técnica é útil para o diagnóstico das massas tumorais e é realizada com auxílio de uma agulha de calibre grosso, guiada com ultra-som. A agulha permite

retirar fragmentos de alguns milímetros de diâmetro e alguns centímetros em comprimento, o que permite a análise do mesmo através do HE convencional, da imuno-histoquímica e da microscopia eletrônica, aumentando a especificidade diagnóstica (ZAMBONI, 2003; IRION et al., 2006). Na presente casuística, este tipo de biópsia foi excluído em razão do número muito pequeno de casos.

#### 2.3.2.7 Biópsia cirúrgica

Através desta técnica, é possível obter espécimes cirúrgicos maiores e está indicada quando os métodos anteriormente citados não foram suficientes para o diagnóstico. A principal vantagem deste procedimento é a remoção de fragmentos em um ou mais segmentos pulmonares, além disso, acrescenta-se a possibilidade de realizar biópsia pleural e pericárdica e dos linfonodos mediastinais. Estes tipos de biópsia podem ser realizados por via toracoscópica (GLASPOLE, 2001).

### 2.4 Classificação histopatológica

A classificação histológica uniforme dos tumores é de grande importância por que facilita a comunicação entre os patologistas e os demais profissionais envolvidos no diagnóstico e tratamento do paciente. (LYDA, 2000; KERR, 2001; SOTTO-MAYOR, 2006).

A primeira classificação aprovada pela OMS é datada de 1967 com o título de *Histological Typing of Lung Tumors* e foi baseada na descrição histológica de Kreyberg (1962). Na década passada, inúmeras contribuições para reavaliar a classificação microscópica, foram trazidas pela Microscopia Eletrônica (ME) e pela Imuno-histoquímica (IHQ), além de estudos sobre anormalidades genéticas do câncer de pulmão (FRANKLIN, 2000; CARVALHO, 2004; CARVALHO, 2006).

De acordo com Brambilla et al. (2002) mudanças foram promovidas na classificação em comparação com a 2ª edição (OMS, 1981). Em 1994 foi proposto por um conjunto de patologistas que formam a *Internacional Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, uma subclassificação dos carcinomas de pulmão de pequenas células. Em 1999, uma terceira reformulação foi publicada, adotada por

patologistas de 14 países, incluindo americanos, japoneses e europeus, coordenados por Dr. William Travis, do Instituto de Patologia das Forças Armadas de Washington, o *Armed Forces Institute of Pathology (AFIP)*.

Essa contribuição ficou conhecida como: *World Health Organization/ International Association for The Study of Lung Cancer - Histological Classification of Lung and Pleural Tumours*; Classificação Histológica dos Tumores Pulmonares e Pleurais da *WHO/IASLC*. Neste sistema, fundamentado na reprodutibilidade (variabilidade mínima interobservador), significado clínico, simplicidade, a minimização do número de lesões não classificadas, foi incluída a descrição de lesões pré-invasivas epidermóides, precursoras do carcinoma escamocelular, a displasia escamosa e o carcinoma “*in situ*” (CIS); de lesões precursoras do adenocarcinoma, a hiperplasia adenomatosa atípica (AAH) e a de carcinóide, a hiperplasia difusa neuroendócrina idiopática (DIPNECH). Outra alteração observada foi a redefinição do carcinoma bronchioloalveolar, restrita a tumores não-invasivos; além de significativa evolução nos conceitos da classificação de tumores neuroendócrinos de pulmão (COLBY et al., 1994; COLBY et al., 1997; BRAMBILLA, 2001).

Estudos conduzidos por patologistas “*experts*” continuam para o esclarecimento dos problemas importantes de classificação, em particular, no que se refere às lesões pré-invasivas, carcinomas de tamanhos extremamente pequenos, encontrados durante o “*screening*” de câncer, já que muitos tumores exibem combinações de padrões morfológicos.

No Brasil, a classificação histológica mais utilizada para o câncer do pulmão é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, tem-se a 4ª edição, publicada em 2004 e que foi adotada no presente estudo. Esta classificação tem a colaboração do *International Agency for Research on Cancer (IARC)* e é conhecida como *World Health Organization Classification of Tumours – Pathology/Genetics –*

*Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, que se encontra de forma reduzida, apresentando somente os tumores malignos no Quadro 1.

Segundo Sotto-Mayor em 2006, esta classificação aborda os critérios da morfologia neuroendócrina, característica nuclear, presença ou ausência de necrose, contagem mitótica e avaliação imuno-histoquímica, conferindo a classificação dos mais frequentes tipos de tumores neuroendócrinos (carcinóide, carcinóide atípico, carcinomas neuroendócrinos de pequenas células e grandes células). Importante ainda, o fato de que a maioria dos carcinomas brônquicos pode ser classificada através da sua aparência na microscopia ótica, o que permite a esta classificação ser validada internacionalmente.

Quadro 1- Classificação de Tumores. Patologia e Genética de Tumores de Pulmão, Pleura, Timo e Coração (OMS, 2004) - Forma simplificada.

#### **TUMORES EPITELIAIS MALIGNOS**

##### **CARCINOMA ESCAMOCELULAR**

- PAPILAR
- CÉLULAS DE CLARA
- PEQUENAS CÉLULAS
- BASALÓIDE

##### **ADENOCARCINOMA**

- SUBTIPO MISTO
- ACINAR
- PAPILAR
- CAB (CARCINOMA BRONQUIOLOALVEOLAR)
  - NÃO MUCINOSO
  - MUCINOSO
  - COMBINADO/MISTO
- SÓLIDO c/ produção de mucina

##### **CARCINOMA PEQUENAS CÉLULAS**

- PEQUENAS CÉLULAS COMBINADO

##### **CARCINOMA GRANDES CÉLULAS**

- CARCINOMA NEUROENDÓCRINO GRANDES CÉLULAS
- CARCINOMA NEUROENDÓCRINO GRANDES CÉLULAS COMBINADO

##### **CARCINOMA ADENOESCAMOSO**

##### **CARCINOMA SARCOMATÓIDE**

- PLEOMÓRFICO
- CÉLULAS GIGANTES
- CARCINOSARCOMA
- BLASTOMA PULMONAR

##### **TUMORES CARCINÓIDES**

- TÍPICO
- ATÍPICO

### **2.4.1 Principais tipos histopatológicos de câncer do pulmão**

Zamboni (2001) classifica os carcinomas broncogênicos sob a ótica da abordagem clínico-terapêutica, estadiamento e tratamento em dois grandes grupos, com diferentes comportamentos biológicos e prognósticos: o grupo do carcinoma pulmonar não pequenas células (CPNPC) e o dos carcinomas pulmonares de pequenas células (CPPC). O primeiro corresponde 80 a 85% dos casos desta neoplasia pulmonar e forma um grupo heterogêneo composto de quatro principais

tipos histológicos distintos: o carcinoma epidermóide, o adenocarcinoma, o tumor carcinóide e o carcinoma indiferenciado de grandes células. O grupo do carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC), representado por 10 a 15% dos casos e com características neuroendócrinas predominantes, destacando-se o carcinoma indiferenciado de pequenas células, com três subtipos celulares: o linfocitóide (*oat cell*), o intermediário e o combinado/*oat cell* (células pequenas + carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma) (HIRSCH, 1989; CAPELOZZI, 2001; SILVA JR, 2004).

Marson et al. (2004) apontaram em seus estudos, que mais de 90% dos carcinomas de pulmão estão compreendidos entre os adenocarcinomas (30-40%), carcinomas escamocelular (30%), carcinomas de pequenas células (20-25%) e carcinomas de grandes células (10-20%). São considerados tipos tumorais específicos, os carcinomas de células escamosas, os adenocarcinomas, os carcinomas de pequenas células e os tumores carcinóides, enquanto os carcinomas de grandes células apresentam-se como um diagnóstico da exclusão.

Oliveira (2002), Silva Jr (2006) e Bahrami (2008) destacaram, que em um pequeno número de casos são representados por tumores pouco diferenciados ou indiferenciados, relacionando-os à biópsias muito pequenas que envolvem pequenas amostras de tecidos difíceis para definição diagnóstica na forma convencional. Nesses casos, estudos adicionais, especialmente a imuno-histoquímica, podem permitir um diagnóstico mais preciso.

A seguir apresentamos as características morfológicas dos principais carcinomas broncogênicos, adequados à classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2004.

#### **2.4.1.1 Carcinoma de pulmão não pequenas células ou CPNPC**

*A) Carcinoma de células escamosas (CCE), Carcinoma escamoso, Carcinoma espinocelular ou Carcinoma epidermóide.*

Macroscopicamente são tumores centrais esbranquiçados ou acinzentados, podendo apresentar pigmentação focal de carbono. Apresentam-se como uma

massa firme, intraluminal ou pode estar infiltrando brônquios e/ou ocluindo o lúmen, resultando em atelectasia. Uma minoria ocorre na periferia do pulmão. Esse tumor pode seguir dois padrões: o intraepitelial, “*in situ*”, sem invasão subepitelial e o endobrônquico, de crescimento poliplóide.

Maiolino et al. (2001) e Moreira et al. (2001) descreveram que este tumor, quando bem diferenciado, apresentam maciços, trabéculas e/ou pequenos aglomerados de células poligonais ou escamosas com núcleo redondo ou ovalado, 1 ou 2 nucléolos bem evidentes, citoplasma geralmente abundante e eosinofílico e pontes intercelulares evidentes, tipicamente organizadas em cordões; as áreas centrais desses maciços são ocupadas por células que formam densas lamelas eosinofílicas concêntricas, caracterizadas como “pérolas de queratina” (pérolas córneas) e mínima atividade mitótica e pleomorfismo nuclear são descritos.

Quando moderadamente diferenciado, apresentam “pérolas de queratina” ocasionais, pobres definições de pontes intercelulares e moderada atividade mitótica com hipercromatismo nuclear; e em pouco diferenciado, quando mostra pouca diferenciação escamosa, mas com acentuada atividade mitótica, pleomorfismo nuclear e hipercromatismo, as pontes intercelulares podem ser focais e de difícil identificação (MAIOLINO et al., 2001).

Na maioria dos casos de carcinoma escamocelular pouco diferenciado à microscopia ótica, a origem da diferenciação escamosa, não pode ser distinguida e são geralmente classificados como carcinoma de grande célula ou carcinoma não pequenas células pouco diferenciado (CAGLE, 1995). Nesses casos a IHQ pode definir o diagnóstico.

## ***B) Adenocarcinoma***

Macroscopicamente, é um tumor acinzentado, podendo ter fibrose central, áreas de cavitações, hemorragia e material gelatinoso.

Moreira et al. (2001) descreveram os adenocarcinomas como tumores sólidos, cujas células caracterizam-se pela formação ou esboço de estrutura glandular e

pode conter muco intracelular. Quando pouco diferenciados, as células podem se arranjar em padrão de “anel de sinete”, com material citoplasmático claro, positivo para Alcian Blue, Mucicarmin e PAS.

Podem ainda, microscopicamente, apresentar padrões definidos: acinar, papilar e sólido com produção de muco, segundo a classificação OMS (2004), sem relevância clínica. Frequentemente, existe uma mistura desses padrões e outras morfologias menos frequentes, com formações glandulares, estruturas papilares e vários tipos de estágios de diferenciação celular (CAGLE, 1995; BRAMBILLA, 2002; CARVALHO et al., 2006).

- Carcinoma bronquioloalveolar ou CBA

O CBA é uma variante do adenocarcinoma e se apresenta como uma neoplasia bem diferenciada. Representa entre de 2% a 3% dos tumores primários de pulmão e ocorrem em brônquios periféricos e septos alveolares, estendendo-se para o espaço aéreo distal, preservando e usando a estrutura do pulmão como estroma (crescimento lepidico). A OMS (2004) considera este tumor como um adenocarcinoma “*in situ*”, sem invasão estromal, vascular ou pleural (CAGLE, 1995; LIU et al., 2000; JAMNIK et al., 2008).

Microscopicamente, as células são cubóides-colunares, citoplasma eosinofílico, com ou sem mucina. Possuem núcleos irregulares hipercrômicos, às vezes com aspecto “*hobnail*” e nucléolos evidentes. Tem crescimento de padrão lepidico entre as paredes alveolares.

### C) Carcinoma pulmonar de grandes células indiferenciado (CGC)

Macroscopicamente é uma massa amolecida grande, rosada, raramente cavitada e com áreas centrais de necrose, usualmente periférica, mas que pode envolver grandes brônquios centrais. Frequentemente invade pleura e estruturas adjacentes.

A OMS (2004) reclassifica os carcinomas de pulmão, classificados em 1999 como carcinomas de grandes células. Introduz-se uma variante desses carcinomas, o carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNGC). As características clínico-

biológicas se assemelham aos carcinomas de pequenas células, no entanto os carcinomas neuroendócrinos de grandes células são classificados como carcinomas não pequenas células, portanto, não há um consenso sobre a estratégia de tratamento desses tumores.

Histologicamente é um tumor epitelial indiferenciado ou pouco diferenciado e o diagnóstico é feito por exclusão, depois de observados os critérios morfológicos, para o diagnóstico dos outros tipos histológicos do CP. Em geral, as células são grandes, poligonais, com núcleos irregulares, nucléolos proeminentes, e cromatina vesicular e estão frequentemente agrupadas em ninhos.

Os CNGC formam maciços irregulares de células grandes, lembrando um quebra-cabeça, ao lado de extensa necrose coagulativa e amoldamento nuclear e possuem diferenciação neuroendócrina (positivo pela IHQ), com freqüentes mitoses e características celulares de carcinoma não pequenas células, ou seja, células em ninhos ou rosetas ou empalilhadas, estrutura organóide e elevado índice mitótico, presença de necrose, relação núcleo/citoplasma (N/C) alta.

Segundo Iyoda et al. (2007), a diferenciação neuroendócrina está na positividade das células tumorais para marcadores neuroendócrinos como a Chromogranina A e a Synaptofisina, CD 56 ou a presença de grânulos neuroendócrinos detectados pela microscopia eletrônica (ME).

#### *D) Tumor carcinóide*

Inicialmente denominados de adenomas brônquicos (Guzmán-Toro et al., 2007), os tumores carcinóides fazem parte do grupo de tumores neuroendócrinos, ao lado do carcinoma de pequenas células e do carcinoma neuroendócrino de grandes células (YOUROSSIAN, 2002). São neoplasias malignas que compreendem entre 1 a 2% dos tumores malignos de pulmão. Em 1914, Gosset e Masson

observaram que os tumores carcinóides se originavam de células granulares do intestino conhecidas como células de Kulchitsky (THOMAS JR. et al., 2001).

Histopatologicamente, estes tumores variam de bem a pouco diferenciados e caracterizam-se por agrupamentos de células poligonais pequenas, com núcleos arredondados, dispostos em cordões que podem adquirir configuração glandular ou alveolar e podem se interpor os septos vasculares. Mitoses são pouco freqüentes.

Em 1981, a classificação OMS classificou os tumores carcinóides em típicos e atípicos, sendo que estes últimos apresentavam alta atividade mitótica e podiam apresentar necrose. A classificação OMS (1999), baseada nos trabalhos de Travis e Sobin utilizaram a combinação de atividade mitótica (mais de 2 mitoses em 2 mm<sup>2</sup> de tumor viável, equivalendo a mais de 2 mitoses em 10 campos de grande aumento, e/ou presença de necrose para separar os típicos dos atípicos.

A OMS (2004) considera estes tumores como parte de um espectro de neoplasias malignas, entre os carcinomas neuroendócrinos de grandes células e carcinomas de pequenas células. São tumores de pequena a média malignidade, com prognóstico melhor que todos os outros carcinomas de pulmão. O prognóstico dos tumores carcinóides típicos é bom, mais de 87% dos pacientes sobrevivem por 10 anos. Diferentemente dos atípicos, que apresenta de 25 a 69% dos pacientes com sobrevida de 5 anos (THOMAS JR. et al., 2001).

#### *E) Carcinomas adenoescamoso ou combinado*

Macroscopicamente, sua localização é periférica podendo conter cicatrizes. Histologicamente apresentam componentes de carcinoma epidermóide e adenocarcinoma, formado ao menos, por mais de 10% de cada tipo de tumor.

#### **2.4.1.2 Carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC)**

Em geral diagnosticados tardiamente e em estágio avançado, o CPPC desenvolvem-se predominantemente nas regiões central e intermediária do pulmão. Possui crescimento rápido e é agressivo, com grande capacidade de invasão vascular, comprometendo grandes extensões do tecido pulmonar e alta capacidade de disseminação para fígado, cérebro, osso e peritônio. Apesar destas características, apresentam uma elevada sensibilidade aos agentes quimioterápicos e radioterápicos (HIRSCH, 1988; JUNKER et al., 2000; ZAMBONI, 2001).

Histopatologicamente é caracterizado por células em maciços, ninhos, cordões e/ou infiltrados difusos, arredondadas, outras vezes fusiformes, pequenas, de citoplasma escasso, bordas não definidas, núcleos ovais, redondos ou fusiformes, semelhantes a grãos de aveia, “*oat cell*”, cromatina granular fina e difusamente distribuída, os nucléolos são raros e pequenos e as mitoses são freqüentes (JUNKER et al., 2000; WHO, 2004; SILVA JR. et al., 2006; MORAM et al., 2009). Na microscopia eletrônica, observam-se grânulos citoplasmáticos neurosecretores. Cerca de 75% dos CPPC e 20% a 25% dos CPNPC têm fenótipo neuroendócrino definido com a expressão de dois ou mais marcadores pela técnica de imunohistoquímica (CARNEY, 1986; SILVA JR. et al., 2006).

## **2.5 MARCADORES DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS DE CÂNCER DO PULMÃO**

### **2.5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

O papel da Imuno-histoquímica é, com freqüência, de grande importância para o diagnóstico histogenético dos tumores de pulmão, inclusive na definição se o tumor é primário ou metastático.

Embora a classificação dessas neoplasias seja possível, na maioria dos casos, através de critérios somente histológicos, acontece que nos que apresentam aspectos pouco diferenciados ou indiferenciados à coloração de rotina, ou naqueles cujas amostras teciduais são exíguas e limitadas muitas vezes por artefatos provocados por esmagamento tissular, os que apresentam necrose tumoral extensa ou ainda por uma limitação ocasionada por sobreposição de aspectos morfológicos, necessitam de ser submetidos às técnicas imunohistoquímicas para confirmação do diagnóstico histopatológico (ALVES, 1999; LYDA, 2000; BARRA, 2006).

Há muitas neoplasias de diferentes origens, metastáticas, que são morfológicamente semelhantes a neoplasias primárias de pulmão e pleura, o que aumenta a importância da imunohistoquímica como um efetivo meio para a distinção entre eles, tornando-a uma poderosa ferramenta diagnóstica para detecção de

marcadores epiteliais, mesenquimais, linfóides, melanocíticos, neuroendócrinos hormonais, etc (TRAVIS et al., 1999; CAPELOZZI, 2001).

Zhang et al. (2005) enfatizaram a necessidade de distinção morfológica precisa entre carcinoma de pequenas células e carcinoma escamocelular pouco diferenciado por sua importância crítica terapêutica, que pode ser limitada por artefatos de esmagamento, necrose tumoral, representação limitada do tumor e a sobreposição de características morfológicas.

Prahl (2003) mostrou que a vantagem de se utilizar a técnica de imunohistoquímica está em sua alta sensibilidade e especificidade, a diversidade de métodos, acrescentando-se a possibilidade de utilização de microscópio de luz comum. Esta técnica permite detectar moléculas (antígenos) teciduais baseados no reconhecimento do antígeno por um anticorpo primário (monoclonal ou policlonal) associado a diferentes processos de visualização (marcados com enzimas e substâncias cromógenas). Assinala-se o emprego recente de polímeros amplificadores da reação contribuindo para o aumento da sensibilidade da técnica. Além disso, a utilização de diversos métodos de recuperação antigênica, de forma que as alterações sofridas pelos tecidos sejam revertidas, a exemplo do aquecimento às altas temperaturas, tratamento com soluções ácidas ou alcalinas ou ainda o uso de detergentes e digestão enzimática, tem contribuído muito para a eficácia do método (RAMOS-VARA e BEISSEHERZ, 2000; RAMOS-VARA e MILLER, 2006; YAMASHITA, 2007).

Jagirdar (2008) se refere como, a técnica empregada para colaborar na separação de Carcinomas de pulmão de pequenas células (CPPC) e Carcinomas de pulmão não pequenas células (CPNPC) e Carcinóides, particularmente em biópsias com amostras pequenas e limitadas por artefatos.

Os marcadores teciduais são componentes celulares que definem alterações celulares e moleculares presentes em células normais e nas neoplásicas. Podemos citar como exemplo, os marcadores de diversas citoqueratinas (CKs) e do fator de transcrição da tiróide (TTF-1) que podem ser úteis no diagnóstico de tumores pulmonares primários, metástases de carcinomas para pulmão, carcinomas extra

pulmonares loco-regionais infiltrando o pulmão e no diagnóstico de neoplasias indiferenciadas. A análise desses marcadores epiteliais pode contribuir para a definição histogenética do tumor (COHEN et al., 1997).

Por outro lado, como não existem marcadores 100% sensíveis ou específicos para cada tumor, à combinação de vários marcadores relevantes é fundamental para a obtenção do diagnóstico correto. Assinala-se que, nem sempre a IHQ poderá definir o diagnóstico, podendo, nesses casos, sugerir diferentes possibilidades diagnósticas que deverão ser investigadas pelos clínicos.

A interpretação de qualquer coloração positiva ou de sua ausência deve ser guiada por estudos morfológicos do tumor, empregando-se os devidos controles e deve ser avaliado por patologista qualificado e experiente dentro do contexto dos achados clínicos e laboratoriais do paciente e de outros testes diagnósticos.

Em seguida, faremos uma breve descrição dos aspectos mais relevantes dos marcadores selecionados para a formação do nosso painel.

### **2.5.1.1 Marcadores de Diferenciação Epitelial**

- **Citoqueratinas (CKs)**

#### **a) CK AE1/AE3 ou CK AE1AE3 (PAN-k)**

São proteínas pan citoqueratinas, solúveis em água, de PM entre 40 a 70 kDa que formam o citoesqueleto de células epiteliais. É um “pool” (mistura) de 2 anticorpos monoclonais obtidos por imunização de camundongos com queratinas humanas, seu padrão é citoplasmático ou perinuclear. Reconhecem um epitopo comum a todos os membros das CKs tipo II ou básicas e as correspondentes CKs tipo I ou ácidas, empregadas na demonstração da natureza epitelial de tumores morfológicamente indiferenciados.

O anticorpo AE1 reage com o determinante antigênico presente na maioria das citoqueratinas da subfamília A, que incluem as CKs 10,13,14,15,16 e 19 e não reage

com as CKs 12,17,e 18. O anticorpo AE3 reage com o determinante antigênico presente na maioria das citoqueratinas da subfamília B, que incluem as CKs 1,2,3,4,5,6,7 e 8 (BROERS et al.,1987, BROERS et al., 1988)

#### **b) CK 7**

É uma citoqueratina de 54 kDa, de peso intermediário, segundo a classificação de Moll, pertencente a subfamília B neutro- básica, expressa principalmente em epitélios simples, na maioria dos epitélios glandulares e em epitélio transicional, intermediário e no subconjunto de adenocarcinomas em vários órgãos, incluindo pulmão; geralmente não marcam para carcinoma escamocelular de pulmão, dessa forma pode ser um marcador preferencialmente específico para células de adenocarcinoma, seu padrão é citoplasmático.

A fenotipagem CK 20/CK 7 de adenocarcinomas é uma ferramenta útil de diagnóstico, se baseia em algoritmos probabilísticos e de abordagens e de uma detalhada base de dados. Embora CK 7/CK 20 sejam filamentos intermediários, são localizados em diferentes células epiteliais. A CK 7 está tipicamente localizada em epitélio de pulmão e mama, enquanto a CK 20 é comum em epitélio de trato intestinal (SU et al., 2006). Su et al. (2006) e Park et al. (2007) referem que alguns marcadores são benéficos para a diferenciação de tumores primários a exemplo da combinação das citoqueratinas CKs 7/20 empregadas para diagnóstico das várias origens do adenocarcinoma metastático.

#### **c) CK 8**

É uma proteína de citoesqueleto (filamentos intermediários) de diferenciação de células epiteliais, característica de epitélio simples de ácinos e ductos glandulares, ausente nos epitélios escamosos e em tecido neoplásico de origem epitelial. Geralmente as citoqueratinas de baixo peso molecular, 40 a 54 kDa, estão distribuídas em epitélio não escamoso, enquanto as de alto peso molecular, 48 a 67 kDa, estão expressas em epitélio escamoso estratificado.

**d) CK 20**

Pertence a classe de proteínas de filamentos intermediários a qual gera citoesqueleto em quase todas as células, forma polipeptídeos de alto peso, 46 kDa, tipicamente ácida, de padrão citoplasmático. Expressa normalmente no epitélio colônico e carcinoma colorretal, útil quando usada em conjunto com a citoqueratina 7, para determinação de sítio primário de carcinoma metastático.

Zou et al. (2003), utilizaram um painel formado pelos anticorpos TTF-1, SP-B, CK7 e CK20 para discriminação entre adenocarcinomas de pulmão primário e metastático, obtiveram resposta positiva para CK7 em todos os adenocarcinomas pulmonares primários. A imunomarcagem positiva e a especificidade da combinação CK7/CK20 em discriminar entre adenocarcinoma primário e metastático foram respectivamente 79% e 94%. Su et al. (2006), confirmaram que a expressão de CK7, CK20 e TTF-1 são imunomarcadores úteis para o diagnóstico de tumores pulmonares e diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma pulmonar primário e adenocarcinomas metastáticos para o pulmão.

**e) CK 34 $\beta$ E12**

Identifica citoqueratinas de aproximadamente 57 kDa a 66 kDa, reconhece um conjunto de citoqueratinas, as CK 1, 5, 10, 14, segundo Moll (68, 58, 56, 50 kDa respectivamente). É uma citoqueratina de alto peso molecular, expressa no complexo epitélio estratificado do pulmão, identificado nas células basais e parabasais dos brônquios normais e em tumores, a sua expressão é restrita principalmente a carcinomas escamosos e carcinomas basalóides, sendo que em adenocarcinomas e carcinomas neuroendócrinos de alto grau são quase sempre negativos, seu padrão é citoplasmático, não reage com hepatócitos, células acinares pancreáticas, tubos proximais renais ou glandulares do endométrio (BRAMBRILLA, 2002; ROSSI et al., 2004).

**f) CK 5/6**

Formado por 2 tipos de citoqueratinas, a CK 5 é tipo básica, de alto peso molecular de 58 kDa. São expressas nas camadas basal, intermediária, superficial de epitélio estratificado, em epitélio escamoso proliferativo, epitélio de transição, células mesoteliais e mesoteliomas. A CK 6 se expressa na epiderme e em situações em que ocorre hiperproliferação, como em tumores epiteliais, são conhecidas como citoqueratinas hiperproliferativas (ALMEIDA JR, 2004).

Segundo Marson et al. (2004) as CK 5/6 são marcadores sensíveis e específicos de carcinoma escamoso de pulmão, chegando a positividade de 100% carcinomas. As CK 5/6 podem ser vistas em tumores epidérmicos benignos e malignos e de origem mucoescamosa e mioepiteliais. É considerada como marcador específico para mesotelioma e usada na identificação de carcinomas escamosos, carcinomas transicionais e mesoteliomas. É usada no diagnóstico diferencial entre carcinoma escamoso pouco diferenciado e adenocarcinoma, expressando positividade em mesoteliomas, carcinomas de células escamosas, células transicionais, diferentemente de adenocarcinomas. Seu padrão é citoplasmático. Ordonez (1998); Tot (2001) demonstraram que a imunomarcagem para CK 5/6 é útil no diagnóstico diferencial entre mesoteliomas pleurais e adenocarcinomas metastáticos de pleura.

#### ***2.5.1.2 Marcadores tumorais específicos; de diferenciação citoplasmática ou de membrana e fatores de transcrição nuclear.***

Segundo Barra (2006) os marcadores citoplasmáticos ou de membranas são proteínas de células com diferenciação terminal, cuja expressão é inversamente proporcional ao grau de diferenciação e que pode estar presente em uma pequena parte da população celular do tumor, a exemplo de apoproteína A do surfactante (SPA), enquanto os marcadores de fatores de transcrição nuclear são proteínas com estrutura modular única, composta de ligações com o DNA e com domínios de regulação (ativação) da transcrição.

## a) SPA

De alta especificidade e moderada sensibilidade para distinção entre tumores primários e secundários de pulmão. É um marcador de padrão citoplasmático e de membrana, expressado pelos pneumócitos II e em uma parcela de carcinoma não pequenas células do pulmão, sendo sua expressão inversamente proporcional ao grau de diferenciação.

Das proteínas específicas (A, B, C e D) do sistema surfactante pulmonar, a de maior concentração é a proteína A surfactante (SP-A). Participante da etiologia das doenças pulmonares atua na defesa do pulmão contra infecções e inflamações, é essencial para a função pulmonar normal. Jiang et al. (2005) se referem ao SP-A, como um marcador de diferenciação única de células epiteliais alveolares pulmonares (pneumócitos tipo II), presente em todo o estado neoplásico e que reconhece algumas células de Clara possibilitando fazer diferenciação entre a maioria dos mesoteliomas e adenocarcinomas pulmonares.

## b) TTF-1

Identificada em 1989 como uma proteína nuclear tecido específica, membro da família do gene NKx<sup>2</sup>, de 40 kD que regula o desenvolvimento, crescimento celular e diferenciação na tireóide, pulmão e de algumas áreas de mama, contendo homodomínio para fatores de transcrição nuclear.

De acordo com Park et al. (2007) a proteína TTF-1 é um fator de transcrição nuclear da tireóide que ativam genes da transcrição da tiroglobulina e thyroperoxidase em células foliculares da tireóide. Segundo Marson et al. (2002) é altamente específico e sensível, presente em células foliculares de tireóide, nos núcleos das células epiteliais das vias respiratórias e em células epiteliais de alvéolos. Rossi et al. (2004) relataram que em tumores pulmonares, o marcador TTF-1 é essencialmente expresso em adenocarcinomas, em tumores neuroendócrinos de grandes células e em carcinomas de pequenas células, sendo pouco freqüente em carcinoma escamocelular. No carcinoma de pulmão não pequenas células, apresentam alta especificidade para adenocarcinoma metastático

e carcinoma primário (TOT, 2001; MARSON et al., 2002; NEDA, et al., 2006; JAGIRDAR et al., 2008).

### **2.5.1.3 Marcadores de Diferenciação Neuroendócrina - Produtos de secreção das células neoplásicas.**

Tumores neuroendócrinos formam um grupo diverso de neoplasias que geralmente expressam, múltiplos marcadores para diferenciação neuroendócrina. Tais marcadores demonstram ser de grande utilização, são caracterizados como grânulos densos no citoplasma celular e pela produção de vários hormônios e neuropeptídeos. Os tumores neuroendócrinos puros são identificados como de linhagem epitelial e com características neurais, enquanto que outras neoplasias muito indiferenciadas mostram diferenciação neuroendócrina “oculta”. Os chamados tumores carcinóides típicos e atípicos são representantes dos carcinomas neuroendócrinos bem e moderadamente diferenciados (BARRA, 2006).

Capelozzi (2001) se refere a marcadores neuroendócrinos como os que definem 75% dos carcinomas de pulmão de pequenas células e 20-25% dos carcinomas de pulmão não pequenas células. Para Barra (2006), os marcadores de diferenciação neuroendócrina em neoplasias epiteliais como as proteínas neuroendócrinas específicas cromogranina A e sinaptofisina, são características dos carcinomas neuroendócrinos independente do sítio anatômico. Sendo o grupo das cromograninas A e B, proteínas da matriz celular associadas a grânulos neuroendócrinos, a utilização somente do marcador para cromogranina A, pode resultar em uma marcação negativa, o que não exclui a possibilidade, de uma neoplasia neuroendócrina, principalmente nos tumores menos diferenciados, positivos para cromogranina B (BARRA, 2006).

#### **a) Chromogranin A (Cg A)**

É uma proteína pró-hormônio com PM 48 kDa, cujo gene codifica 439 aminoácidos, localiza-se no cromossoma 14, possui peptídeos potencialmente ativos e biologicamente derivam da cromogranina “vasostatin”, “cromostatin”, presente em situação de metástase e em neoplasias primárias com características histológicas sugestivas de uma diferenciação neuroendócrina. Está presente em grânulos

secretórios de células endócrinas e neurônios e seu padrão é citoplasmático granular.

Segundo Jansen et al. (1990) a cromogranina foi originalmente isolada de grânulos de cromafim, grânulos da medula adrenal e tem sido encontrada expressa em uma variedade de tecidos humanos normais e neoplásicos que produzem hormônio polipeptídeo, está associada à co-secreção de uma ampla variedade de hormônios, provavelmente participa do processo secretor.

O uso da CgA como marcador neuroendócrino, de um modo geral , está limitado a neoplasias contendo grânulos secretórios, no caso dos carcinomas de pequenas células. É detectada em 25 a 40% dos carcinomas de pequenas células e em 5% dos carcinomas de não pequenas células. Jansen et al. (1990) demonstraram a necessidade de outros marcadores neuroendócrinos com maior sensibilidade e especificidade e concluiu que a sinaptofisina foi mais sensível e específico marcador de diferenciação neuroendócrina, quando comparado a cromogranina.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Este trabalho tem como finalidade apresentar um estudo retrospectivo do CP, diagnosticados no Serviço de Histopatologia (SH) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM, FIOCRUZ, BAHIA), entre os períodos de 1986 a 2004, comparando os diagnósticos morfológicos iniciais com aqueles obtidos com a presente investigação, acrescentando-se a imuno-histoquímica.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Identificar os casos de câncer de pulmão existentes no SH do CPqGM, entre os anos de 1986 a 2004;
- Rever as lâminas histológicas de biópsias pulmonares (biópsias brônquicas / BB e biópsia transbrônquicas / BTB), com diagnóstico de neoplasia pulmonar, neste período;
- Classificar histogeneticamente as neoplasias pulmonares, através de painel imuno-histoquímico mínimo proposto, baseado nos tipos histológicos do CP, de acordo com a classificação da OMS (2004);
- Comparar os diagnósticos histomorfológicos iniciais com aqueles obtidos com a segunda análise, sem e com imuno-histoquímica para marcadores de neoplasias pulmonares;
- Listar os principais aspectos clínicos e epidemiológicos correspondentes aos pacientes com diagnóstico de CP, neste período.

## **4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento da pesquisa e Casuística**

O presente trabalho trata-se de um estudo analítico, retrospectivo com delineamento transversal, histológico e imuno-histoquímico.

Foi realizado um levantamento de casos encaminhados ao SH do CPqGM, no período de 1986 a 2004. Deste total, foram agrupados os casos que correspondiam a patologias pulmonares e, neste grupo, identificados aqueles correspondentes a neoplasias pulmonares, diagnosticados em BB e BTB.

Este trabalho contou com a participação direta do Hospital Especializado Otávio Mangabeira (HEOM). Este hospital é uma entidade terciária do Sistema Único de Saúde (SUS), vinculada ao estado da Bahia, voltada para o atendimento de doenças torácicas.

Apenas casos do HEOM foram incluídos nesta amostra. Indisponibilidade do bloco de parafina e exiguidade do material corresponderam aos critérios de exclusão.

### **4.2 Considerações Éticas**

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com seres Humanos do CPqGM e obteve parecer favorável (nº 75/2005).

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1 Avaliação Morfológica**

Para a revisão histológica, cortes de 4µm foram obtidos dos casos incluídos nesta amostra e corados através da técnica de Hematoxilina e Eosina (H/E). A análise foi realizada em microscopia de luz convencional utilizando um microscópio *Olympus BX51* por um único patologista experiente e segundo a classificação

atualizada de câncer de pulmão da OMS (2004), conforme descrito no Quadro 1. Cabe ressaltar, que este avaliador não teve conhecimento dos laudos prévios dos casos incluídos na amostra (estudo cego).

Após a reavaliação histológica, foi realizada análise comparativa entre a conclusão histológica na ocasião do primeiro diagnóstico e o da segunda análise e calculado o índice de concordância Kappa (Tabela 1).

Tabela 1: Interpretação dos valores de Kappa.

<b>Kappa</b>	<b>Concordância</b>
≥ 0,8	Quase perfeita
0,6 – 0,79	Grande
0,4 – 0,59	Moderada
0,2 – 0,39	Leve
0 – 0,19	Pobre
< 0	Ausente

#### **4.3.2 Encaminhamento dos casos para a IHQ e definição histogenética**

Os casos nos quais não foi possível pelo exame histológico em HE, estabelecer uma classificação diagnóstica na ocasião da segunda análise, aqueles em que não houve concordância entre as duas avaliações: os denominados de carcinomas pouco diferenciados/ indiferenciados e aqueles casos considerados de diagnóstico difícil, mas com suspeitas diagnósticas divergentes, foram submetidos a exame imuno-histoquímico, conforme descrito abaixo, utilizando o sistema EnVision™ (DAKO Corporation, Carpinteria, USA). Esses casos perfazem um total de 101.

Foram obtidos cortes histológicos de 4µm do material emblocado em parafina e estendidos sobre lâminas previamente tratadas e silanizadas. A desparafinização dos cortes foi realizada com dois banhos de xilol com duração de 10 minutos cada e a hidratação do material com álcool etílico absoluto e em concentrações

decrecentes, em quatro tempos de 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e seguiram para a recuperação antigênica, utilizando um tampão citrato, na concentração de 0,01M e pH 6,0 por 30 minutos, em calor úmido a 96°C (banho-maria). Os cortes foram submetidos a solução bloqueadora de peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3%, em metanol), por 10 minutos em TA.

Baseado em dados da literatura e experiência do patologista, foi definido um painel mínimo de anticorpos, capaz de estabelecer e diferenciar os grupos histológicos das neoplasias pulmonares mais frequentes. Os clones, diluições e marca comercial dos anticorpos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados na pesquisa.

<b>ANTICORPO</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Clone</b>	<b>Reatividade</b>
CK AE1/AE3	DAKO	1:200	AE1/AE3	Pool de CK utilizado para demonstração da natureza epitelial de tumores, geralmente os carcinomas são positivos para CKAE1/ AE 2.
CK 8	DAKO	1:100	35βH11	CK baixo PM, característica de epitélios simples de ácinos e ductos glandulares, ausente em epitélios escamosos.
CK 34 βE12	DAKO	1:200	34βE12	CK de alto PM, características de epitélio escamoso e ductais, são negativas em epitélios simples.
CK 5/6	DAKO	1:200	D5/16B4	CK de alto PM, básica, expressas em epitélios, células mesoteliais são positivas para carcinomas escamosos.
CK 20	DAKO	1:50	K <sub>s</sub> 20.8	CK de alto PM, são positivas para carcinomas do tubo digestivo, de grande utilidade quando usada em conjunto com a CK 7 na determinação de sítio primário de carcinoma metastático.
CK 7	DAKO	1:200	OV-TL 12/30	CK baixo PM, utilizada na distinção de determinados grupos de adenocarcinomas, carcinomas de ovário, pulmão, mama, geralmente são negativos para carcinoma de tubo digestivo, próstata.
SPA	DAKO	1:400	PE 10	Marcador diferencial de células epiteliais alveolares de pulmão (pneumócito II) reconhece células Clara em adenocarcinomas. Evidencia surfactante pulmonar, positiva nos adenocarcinomas pulmonares.
TTF-1	DAKO	1:200	8G7G3/1	Fator de transcrição da tireóide, expresso em tumores do pulmão e da tireóide, em pneumócitos tipo II e células Clara.
Chromogranin A	DAKO	1:400	DAK-A3	Proteína componente dos grânulos secretórios, células endócrinas e neurônios, de grande utilidade na detecção de tumores de diferenciação neuroendócrina.

Para determinar as melhores diluições dos anticorpos primários pesquisados, foram realizados estudos pilotos, levando em consideração as diluições sugeridas pelo fabricante e as utilizadas na rotina do Laboratório de Imuno-histoquímica do CPqGM.

Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram diluídos em solução de Tris-HCL 0,05mol/L, com 0,1% de Tween e proteínas redutoras de background (COD. S3022, DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e incubados em câmara úmida, em temperatura ambiente durante 60 minutos.

As reações imuno-histoquímicas foram reveladas com a incubação dos cortes com o cromógeno DAB (3,3' Diaminobenzidina), na diluição de 20 $\mu$ L/mL do tampão de cromógeno, por 5 minutos, sendo a reação interrompida no momento ideal, com lavagens sucessivas em água destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por cerca de 30 segundos, lavados em água corrente e destilada, sendo desidratadas em etanol absoluto, diafanizadas em xilol e montados com lâminulas em Bálsamo do Canadá.

Para o controle negativo das reações, o anticorpo primário foi substituído por soro albumina bovina diluída em PBS. Os controles positivos dos antígenos pesquisados, incluídos na análise IHQ, equivalem a casos selecionados e previamente diagnosticados durante as avaliações de IHQ na rotina do laboratório, bem como aos controles internos.

#### **4.4 Análise dos Dados**

As lâminas submetidas a reações imuno-histoquímicas foram analisadas em microscopia óptica. A leitura de todos os casos foi executada pelo pesquisador orientador em conjunto com a orientanda e as observações anotadas em planilha para posterior avaliação estatística.

A intensidade da imunorreatividade dos marcadores foi graduada em ausente (-); raras células positivas (+/-); discreta (+); moderada (++) ou intensa (+++); de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Imunorreatividade dos marcadores formadores do painel.

<b>Graduação</b>	<b>Imunorreatividade</b>
(-)	Ausente
(+/-)	Raras células positivas (< 5% células coradas)
(1+)	Discreta (< 25% das células coradas)
(2+)	Moderada (26% - 50% das células coradas)
(3+)	Intensa (>50% das células coradas)

Os dados foram compilados em planilhas de programa Excel e submetidos a análise estatística para o cálculo de Índice Kappa, utilizando o programa operacional BioEstat versão 4.0. Os dados gerados serviram de base para as análises das freqüências de concordâncias positiva e negativa em relação a 1ª análise HE x 2ª análise HE; 1ª análise HE x 2ª análise HE+ IHQ e o estudo somente dos casos com IHQ, HE x IHQ. Além disso, analisou-se o papel dos marcadores imunohistoquímicos na definição histogenética dos casos rotulados no HE como neoplasias malignas indiferenciadas / carcinomas pouco diferenciados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Casuística

Durante o período de 2006 e 2007, foi realizado o levantamento de casos de neoplasias de pulmão nos arquivos do Serviço de Histopatologia (SH) do CPqGM (FIOCRUZ-Ba), entre os anos de 1986 a 2004.

Foi identificada a totalidade geral de casos, a totalidade de casos de procedência pulmonar, o total de casos de neoplasias de pulmão e o total de casos de neoplasias de pulmão obtidos por biópsias brônquica e transbrônquica, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Total de exames anatomopatológicos, casos de neoplasias pulmonares e biópsias pulmonares, encaminhados ao CPqGM entre 1986 a 2004.

Ano	Ex. AP total	Ex. AP pulmonar	Ex. AP neoplasia de pulmão (BB/BTB/PC)	Ex. AP neoplasia de pulmão (BB/BTB)
1986	1430	24	5	5
1987	1594	17	8	5
1988	1287	0	0	0
1989	1452	0	0	0
1990	1792	47	13	7
1991	1531	62	22	14
1992	543	0	0	0
1993	1315	89	36	27
1994	1242	25	10	6
1995	1167	10	0	0
1996	985	11	0	0
1997	1273	23	8	5
1998	562	1	0	0
1999	561	1	0	0
2000	1047	61	22	20
2001	1204	51	20	17
2002	2206	208	65	57
2003	2599	200	55	43
2004	1226	126	40	38
<b>Total</b>	<b>25016</b>	<b>956</b>	<b>304</b>	<b>244</b>

**Legendas: Ex. AP: Exame anatomopatológico; BB: biópsias brônquicas; BTB: biópsias transbrônquicas; PC: Peças cirúrgicas**

No período que correspondeu ao estudo (1986-2004), o SH recebeu 25016 casos para exame anatomopatológico, correspondendo a 956 casos de doenças pulmonares (3,8%) que foram encaminhados através de biópsias brônquicas (BB), biópsias transbrônquicas (BTB) e peças cirúrgicas (PC).

Neoplasias pulmonares corresponderam a 1,2% (n=304) do total de casos no período (Tabela 5). Entretanto, deste total de neoplasias pulmonares, 34 foram excluídas do estudo, devido à indisponibilidade no arquivo do SH/CPqGM, exigüidade do material para análise histológica, além de 26 de peças cirúrgicas. Desta forma, foram incluídos nesta casuística, 244 casos obtidos através de 217(88,9%) amostras de BB e 27(11,1%) de BTB.

Tabela 5: Levantamento de casos de câncer de pulmão do SH/CPqGM/FIOCRUZ, entre 1986-2004.

<i>Período 1986-2004</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
<i>Total de exames AP</i>	25016	100
<i>BB/BTB/PC Total</i>	956	3,80
<i>BB/BTB/PC pulmonar</i>	304	1,20
<i>BB/BTB</i>	244	0,97

**Legendas:** a) AP: anatomopatológico; PC: Peça Cirúrgica; BB: Biópsia Brônquica; BTB: Biópsia Transbrônquica;

b) 34 casos foram excluídos do estudo pela indisponibilidade e/ou exigüidade de material

c) 26 casos de peças cirúrgicas foram retirados do estudo

## 5.2 Dados Epidemiológicos

O sexo masculino contribuiu com 66,4 % dos casos (n=162) e o feminino com 33,6 % (n=82). Foi possível obter a idade de 224 (91,8%) pacientes. A idade média, neste grupo correspondeu a 59,5 anos com desvio-padrão de 11,8 anos. A distribuição dos pacientes, por faixa etária, está descrita na Figura 1.

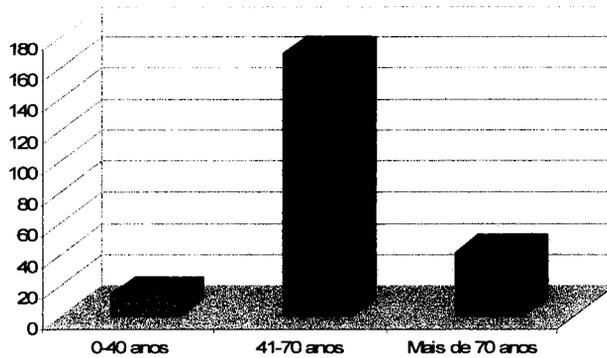


Figura 1: Distribuição dos pacientes por faixa etária.

Do total de pacientes incluídos nesta amostra, 152 casos (62,3%) apresentaram informações clínicas. Em 40,1% (n=61) foi relatado o tabagismo; tosse em 23,0% (n=35); perda de peso em 22,4% (n=34); dor torácica em 19,7% (n=30); atelectasia em 18,4% (n=28); dispnéia em 15,1% (n=23); hemoptise em 13,2% (n=20) e febre em 5,3% (n=8), conforme mostra a Figura 2.

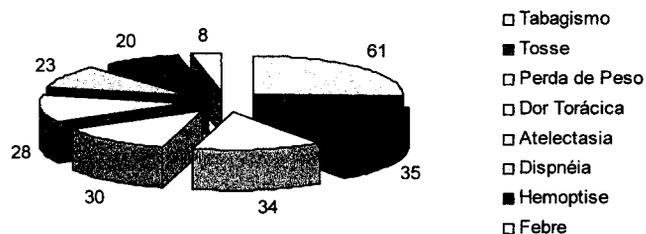


Figura 2: Principais informações clínicas.

### 5.3 Análise Morfológica

Inicialmente, os diagnósticos histomorfológicos dos casos selecionados foram listados, considerando os laudos no momento do diagnóstico e agrupados, segundo os princípios diagnósticos da classificação da OMS (2004). Verificou-se um predomínio do carcinoma escamocelular em 45,1% (n=110) seguido de adenocarcinoma em 19,7% (n=48). Os mesmos casos foram re-avaliados por um examinador (estudo cego) que reclassificou-os segundo os principais diagnósticos da classificação da OMS (2004), obtendo-se os seguintes resultados: 31,1% (n=76) de carcinomas escamocelular, 20,9% (n=51) de adenocarcinomas. A frequência

específica de cada subtipo histológico de neoplasia pulmonar, considerando o diagnóstico inicial (1ª análise em HE) e o diagnóstico da revisão (2ª análise em HE), encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6: Subtipos histológicos das neoplasias malignas pulmonares no período de 1986 a 2004, considerando o diagnóstico inicial e o diagnóstico da revisão.

Tipo histológico (HE)	n (%) Diagnóstico inicial	n (%) Diagnóstico da revisão
	1ª análise (HE)	2ª análise (HE)
Carcinoma escamocelular	110 (45,1)	76 (31,1)
Adenocarcinoma	48 (19,7)	51 (20,9)
Carcinoma de pequenas células	31 (12,7)	32 (13,1)
Carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado	31 (12,7)	10 (4,1)
Carcinoma não pequenas células pouco diferenciado	7 (2,9)	48 (19,7)
Neoplasia maligna indiferenciada	5 (2,0)	17 (7,0)
Sarcoma/ Linfoma	4 (1,6)	2 (0,8)
Tumor carcinóide	3 (1,2)	3 (1,2)
Carcinoma de grandes células	2 (0,8)	0 (0)
Adenoma	2 (0,8)	0 (0)
Carcinoma bronquioloalveolar	1 (0,4)	5 (2,0)
<b>TOTAL</b>	<b>244 (100)</b>	<b>244 (100)</b>

Na 1ª avaliação em HE dos tumores, 75% (n=183) apresentaram informações quanto à diferenciação histológica, de forma que: 7,1% (n=13), eram bem diferenciados; 26,8% (n=49), moderadamente diferenciados; 50,8% (n=93), pouco diferenciados e 15,3% (n=28), anaplásicos. A 2ª avaliação em HE dos tumores contribuiu com 92,2% (n=225) das informações quanto à diferenciação histológica, definindo como: 9,3%, (n=21) bem diferenciados; 13,8% (n=31), moderadamente diferenciados; 54,7% (n=123) pouco diferenciados e 22,2% (n=50) anaplásicos. Para os demais subtipos histológicos, os referidos dados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Tipos histológicos e graus de diferenciação celular na 1ª e 2ª avaliação em HE.

Tipos histológicos (HE)	Graus de diferenciação celular: 1ª / 2ª avaliação em HE			
	bem diferenciado	moderadamente diferenciado	pouco diferenciado	anaplásico
Carcinoma escamocelular	13 /21	41/25	38/28	0/0
Adenocarcinoma	0/0	8/6	27/37	0/0
Carcinoma não pequenas células	0/0	0/0	7/48	0/0
Carcinoma de pequenas células	0/0	0/0	1/0	6/31
Carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado	0/0	0/0	18/10	13/0
Neoplasia indiferenciada	0/0	0/0	0/0	5/17
Outros	0/0	0/0	2/0	4/2
<b>TOTAL</b>	<b>13/21</b>	<b>49/31</b>	<b>93/123</b>	<b>28/50</b>

A 1ª avaliação em HE reconheceu 17,6% (n=43) carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados (carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, carcinoma pouco diferenciado/indiferenciado e neoplasia maligna indiferenciada), enquanto que a 2ª avaliação em HE reconheceu, 30,7% (n=75) deste mesmo grupo. Considerando o primeiro diagnóstico, 36,1% (n=88) apresentaram discordância nos resultados, obtendo-se um Índice Kappa= 0.2571; concordância leve.

Em relação ao primeiro diagnóstico em HE, houve discordância, principalmente nos seguintes grupos: carcinoma escamocelular em 46,6% (n=41), adenocarcinoma em 13,6% (n=12) e em carcinoma pouco diferenciado/ indiferenciado/ neoplasia indiferenciada 28,4% (n=25). A frequência de discordância nos demais grupos de tumores está representada na Tabela 8.

Tabela 8: Freqüência de discordância entre primeira e segunda análise em HE, segundo os grupos tumorais.

Tipos Histológicos	n	%
Carcinoma escamocelular	41	46,6
Adenocarcinoma	12	13,6
Carcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado	25	28,4
Carcinoma de grandes células	1	1,1
Tumor carcinóide	2	2,3
Carcinoma de pequenas células	4	4,5
Linfoma e Sarcoma	3	3,4
<b>TOTAL</b>	<b>88</b>	<b>100</b>

Neste estudo, calculamos a variação interobservador da análise histológica, em dois momentos distintos, apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Variação interobservador da análise histológica em HE (1ª análise e 2ª análise).

244 Casos	Segunda análise (HE)	
Primeira Análise (HE)	Concordância Positiva (%)	Concordância Negativa (%)
	156 (63,9)*	88 (36,1)

\* Índice de Cohen's kappa= 0,2571 (leve)

#### 5.4 Análise Imuno-histoquímica

Cento e um tumores (41,4%) do total de casos foram indicados para definição histogenética através da IHQ. Neste grupo, 62 (61,4%) correspondiam a casos onde houve discordância entre o primeiro diagnóstico e análise posterior e 39 (38,6%) casos, identificados como de difícil definição histogenética através de análise convencional em HE.

Deste total encaminhado a IHQ, 66,3% (n=67) dos tumores correspondem aos definidos como carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados (carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, carcinoma pouco diferenciado/

indiferenciado e neoplasia indiferenciada) e 33,7% (n=34) das demais neoplasias, definidas como casos difíceis de avaliação diagnóstica pelo HE, mas, com as seguintes suspeitas diagnósticas ainda no HE: carcinoma escamocelular, 13,9% (n=14); adenocarcinomas, 7,9% (n=8); carcinoma anaplásico de pequenas células, 8,9% (n=9); tumor carcinóide, 1% (n=1); carcinoma bronquioloalveolar, 1% (n=1); sarcoma, 1% (n=1). Os tumores encaminhados à análise IHQ após a 2ª avaliação em HE são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Frequência das suspeitas diagnósticas de todos os tumores encaminhados à análise através da IHQ, após a 2ª avaliação em HE.

Tipo histológico (HE)	n (%)
Carcinoma não pequenas células pouco diferenciado	42 (41,6)
Carcinoma escamocelular	14 (13,9)
Neoplasia indiferenciada	13 (12,9)
Carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado	12 (11,9)
Carcinoma anaplásico de pequenas células	9 (8,9)
Adenocarcinoma	8 (7,9)
Tumor carcinóide	1 (1)
Carcinoma bronquioloalveolar	1(1)
Sarcoma	1(1)
Total	101(100)

#### 5.4.1 Imunomarcação

Considerando o painel de marcadores, apresentamos os resultados da imunomarcação e as respectivas frequências, conforme a Tabela 11.

Tabela 11: Frequência de positividade dos marcadores imuno-histoquímicos e subtipos histológicos das neoplasias de pulmão, estudadas em BB e BTB.

Classificação	CK AE <sub>1</sub> /AE <sub>3</sub> %	CK 8 %	CK 34βE12 %	CK 7 %	CK 20 %	CK 5/6 %	Cg A %	TTF-1 %	SPA %
Carcinoma escamocelular	17/30 56,7	5/30 16,7	27/30 90,0	1/30 3,3	0/30 0	17/30 56,7	1/30 3,3	0/30 0	0/30 0
Adenocarcinoma	15/21 71,4	12/21 57,1	4/21 19,0	15/21 71,4	0/21 0	0/21 0	0/21 0	1/21 4,8	4/21 19,0
Tumor carcinóide	4/19 21,1	8/19 42,1	7/19 36,8	3/19 15,8	1/19 5,3	2/19 10,5	16/19 84,2	0/19 0	0/19 0
Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	3/7 42,9	2/7 28,6	0/7 0	0/7 0	0/7 0	0/7 0	3/7 42,9	0/7 0	0/7 0
Carcinoma neuroendócrino de grandes células	0/1 0	1/1 100	0/1 0	1/1 100	0/1 0	0/1 0	1/1 100	0/1 0	0/1 0
Carcinoma Adenoescamoso	1/1 100	1/1 100	1/1 100	1/1 100	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	1/1 100
Carcinoma não pequenas células pouco diferenciado	6/8 75,0	3/8 37,5	2/8 25,0	0/8 0	0/8 0	0/8 0	0/8 0	0/8 0	0/8 0

Nota: CK AE<sub>1</sub>/AE<sub>3</sub> = pan citoqueratinas AE<sub>1</sub> e AE<sub>3</sub>; CK 8 = citoqueratina 8; CK 34βE12 = citoqueratina 34βE12; CK 7 = citoqueratina; CK 20 = citoqueratina 20; CK 5/6 = citoqueratina 5 e citoqueratina 6; TTF-1 = fator de transcrição da tireóide; SP-A = proteína surfactante A.

Para considerar estes diagnósticos, cada grupo de tumor, foi submetido ao painel proposto no estudo e apresentou as seguintes características quanto a imunomarcção:

a ) Marcadores de diferenciação epitelial / Citoqueratinas

- CK AE1/AE3 - A imunoreatividade para esta citoqueratina esteve presente em 17 de 30 (56,7%) dos casos de *carcinoma escamocelular*, em 15 de 21 (71,4%) dos casos de *adenocarcinoma*; em 4 de 19 (21,1%) dos casos de *tumor carcinóide*; em 3 de 7 (42,9%) dos casos de *carcinoma neuroendócrino de pequenas células*. Este marcador foi reativo para o único caso de *carcinoma adenoescamoso*, enquanto no caso de *carcinoma neuroendócrino de grandes células* não foi observado reatividade. Os casos identificados como *carcinoma não pequenas células pouco diferenciado*, apresentaram imunoreatividade em 6 de 8 (75%) dos casos.
- CK 8 – Esta citoqueratina apresentou imunoreatividade em 12 de 21 (57,1%) dos casos de *adenocarcinoma*; em 8 de 19 (42,1%) dos casos de *tumor carcinóide*; em 5 de 30 (16,7%) dos casos de *carcinoma escamocelular*; em 2 de 7 (28,6%) dos casos de *carcinoma neuroendócrino de pequenas células*; em 3 de 8 (37,5%) dos casos de *carcinoma não pequenas células pouco diferenciado*. Nos isolados casos de *carcinoma neuroendócrino de grandes células* e *carcinoma adenoescamoso*, também observamos marcação.
- CK 34βE12 - A imunoreatividade foi observada em 27 de 30 (90%) dos casos de *carcinoma escamocelular*; em 7 de 19 (36,8%) dos casos de *tumores carcinóides*; em 4 de 21 (19,0%) dos casos de *adenocarcinoma*, em 2 de 8 (25%) dos casos de *carcinoma não pequenas células pouco diferenciado*. Não foi observado imunoreatividade em nenhum dos casos de *carcinomas neuroendócrino de pequenas células*. No único caso de *carcinoma adenoescamoso*, foi observado marcação para esta citoqueratina.
- CK 7 - Observamos reatividade para esta citoqueratina, em 15 de 21 (71,43%) dos casos de *adenocarcinoma*; em 3 de 19 (15,8%) dos casos de

*tumor carcinóide*; em 1 de 30 (3,3%) dos casos de *carcinoma escamocelular*, em 1 de 1 (100%) dos casos de *carcinoma neuroendócrino de grande células e adenoescamoso*; nos casos de *carcinoma neuroendócrino de pequenas células* e *carcinoma não pequenas células pouco diferenciado*, não foi observado reatividade.

- CK 20 - Somente em 1 de 19 (5,3%) casos de *tumor carcinóide*, apresentou imunoreatividade. Nas demais neoplasias foi negativa.
- CK 5/6 - Em 17 de 30 (56,7%) dos casos de *carcinoma escamocelular*, apresentaram imunoreatividade e em 2 de 19 (10,5%) dos casos de *tumor carcinóide*. Nas demais neoplasias, não observamos reatividade.

b) Marcadores tumorais específicos; de diferenciação citoplasmática ou de membrana e fatores de transcrição nuclear.

- TTF-1 - Foi apresentada imunoreatividade somente em 1 de 21 dos casos (4,8%) de *adenocarcinoma*, sendo negativa nos demais tumores.
- SPA - Foi apresentada imunoreatividade em 4 de 21(19,0%) dos casos de *adenocarcinoma* e em um único caso de *adenoescamoso* e negativa nas outras neoplasias.

c) Marcadores neuroendócrinos / Produtos de secreção das células neoplásicas.

- Chromogranin A ( CgA) - A imunoreatividade esteve presente em 16 de 19 (84,2%) dos casos de *tumores carcinóides*, em 3 de 7 (42,9%) dos casos de *carcinomas neuroendócrinos de pequenas células* e, particularmente, em um único caso de *carcinoma escamocelular* (3,3%).

Após a análise imuno-histoquímica, os 101 tumores foram classificados histogeneticamente e distribuídos como: carcinoma escamocelular, 29,7% (n=30); adenocarcinoma, 20,8% (n=21); tumor carcinóide, 18,8% (n=19); carcinoma neuroendócrino de pequenas células, 6,9% (n=7); carcinoma neuroendócrino de

grandes células, 1,0% (n=1); carcinoma adenoescamoso, 1,0% (n=1); linfoma/sarcoma, 4,9% (n=5). Mesmo após a IHQ, oito casos (7,9%) permaneceram com o diagnóstico de carcinoma não pequenas células pouco diferenciado e 2,0% (n=2) continuaram como neoplasia maligna indiferenciada. Foi possível definir histogeneticamente 93,1% (n=94) dos casos e 6,9% (n=7) deixaram de ser avaliados por ausência de tecido tumoral nas secções (exiguidade de material). Os resultados acima descritos podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12: Frequência dos subtipos histológicos das neoplasias após análise imuno-histoquímica, confrontando com as suspeitas diagnósticas.

Tipos histológicos	Suspeitas diagnósticas na 2ª análise (HE)		
	Carcinoma pouco diferenciado/ indiferenciado (%)	Outras suspeitas diagnósticas (%)	TOTAL / IHQ (%)
Carcinoma escamocelular	16 (13,9)	14 (15,8)	30 (29,7)
Adenocarcinoma	13 (12,9)	8 (7,9)	21 (20,8)
Tumor carcinóide	15 (14,8)	4 (4,0)	19 (18,8)
Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	2 (2,0)	5 (4,9)	7 (6,9)
Carcinoma neuroendócrino de grandes células	1(1,0)	0 (0)	1 (1,0)
Carcinoma não pequenas células pouco diferenciado/ indiferenciado	7(6,9)	1(1,0)	8 (7,9)
Carcinoma adenoescamoso	1(1,0)	0 (0)	1(1,0)
Neoplasia indiferenciada	2 (2,0)	0 (0)	2 (2,0)
Linfoma/ sarcoma	5 (4,9)	0 (0)	5 (4,9)
Falta tecido tumoral	5 (4,9)	2 (2,0)	7 (6,9)
<b>TOTAL</b>	<b>67</b>	<b>34</b>	<b>101(100)</b>

Em relação aos casos de carcinomas pouco diferenciados / indiferenciados que foram submetidos a IHQ, os resultados apresentaram as seguintes distribuições histogenéticas: carcinoma escamocelular, 13,9% (n=16); adenocarcinoma, 12,9% (n=13); tumor carcinóide, 14,8 % (n=15); carcinoma neuroendócrino de pequenas células, 2,0% (n=2); carcinoma neuroendócrino de grandes células, 1,0% (n=1); carcinoma adenoescamoso, 1,0% (n=1); linfoma/ sarcoma, 4,9% (n=5); carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, 6,9% (n=7); neoplasia maligna indiferenciada, 2,0% (n=2) e em 4,9% (n=5), não foi observado tumor nas lâminas para avaliação. Esses resultados estão demonstrados no Quadro 2.

Quadro 2: Modificação no Diagnóstico após IHQ

CARCINOMA POUCO DIFERENCIADO OU INDIFERENCIADO: 67 (66,3%)	
	Carcinoma escamocelular: 16 (13,9%)
	Adenocarcinoma: 13 (12,9%)
	Tumor carcinóide: 15 (14,8%)
	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células: 2 (2,0%)
	Carcinoma neuroendócrino de grandes células: 1 (1,0%)
	Carcinoma não pequenas células pouco diferenciado: 7 (6,9%)
	Carcinoma adenoescamoso: 1 (1,0%)
	Outras neoplasias: 5 (4,9%)
	Neoplasia maligna indiferenciada: 2 (2,0%)
	Falta de tumor nas secções histológicas: 5 (4,9%)

Quanto aos 34 tumores restantes, constituídos por casos difíceis para definição histogenética no HE (mas com diferentes suspeitas diagnósticas), foram observadas as seguintes frequências: carcinoma escamocelular, 15,8% (n=14); adenocarcinoma, 7,9% (n=8); tumor carcinóide, 4,0% (n=4); carcinoma neuroendócrino de pequenas células, 4,9% (n=5); carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, 1,0% (n=1) e em 2,0% (n=2), não foi possível avaliação por falta de tumor nas secções (Tabela 12).

Foi possível verificar a modificação do diagnóstico entre a análise histológica e análise através da IHQ, conforme Tabela 13.

Tabela 13: Modificação do diagnóstico entre a análise histológica e análise através da IHQ, de câncer de pulmão.

101 Casos	Segunda análise (HE+IHQ)	
Segunda análise (HE)	Concordância Positiva (%)	Concordância Negativa (%)
	29 (28,7)*	72 (71,3)

\* Índice de Cohen's kappa= 0,2871 (leve)

Comparamos finalmente, a avaliação dos tumores, classificados na 2ª análise em HE através da IHQ conjuntamente com todos os demais casos e obtivemos os resultados apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Variação entre a análise baseada na histologia e a análise histológica associada a IHQ no total de casos estudados

244 Casos	Segunda análise (HE+IHQ)	
Primeira Análise (HE)	Concordância Positiva (%)	Concordância Negativa (%)
	177 (72,5)*	67 (27,5)

\* Índice de Cohen's kappa= 0,7254 (Grande)

Finalizamos os resultados, apresentando a frequência de cada subtipo histológico de neoplasia pulmonar, considerando as 1ª e 2ª análises em HE e a análise acrescida de HE+IHQ, representadas na Tabela 15.

Tabela 15: Subtipos histológicos das neoplasias malignas pulmonares no período de 1986 a 2004, considerando o 1º e 2º diagnósticos em HE e a análise HE+IHQ

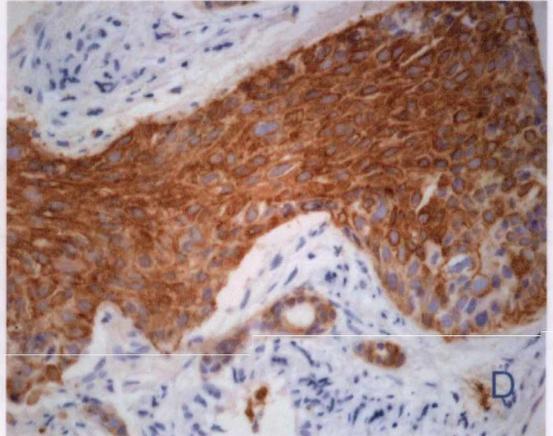
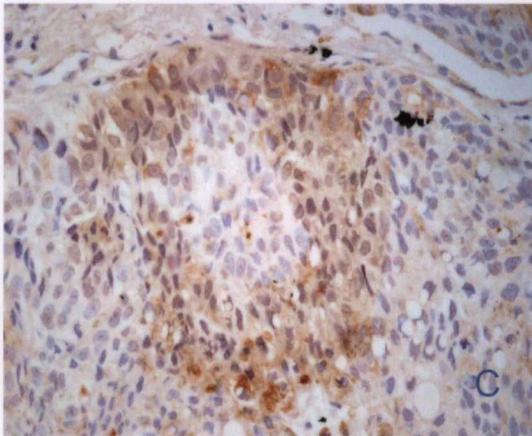
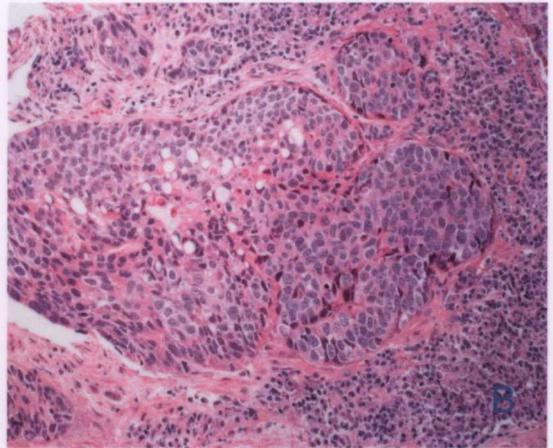
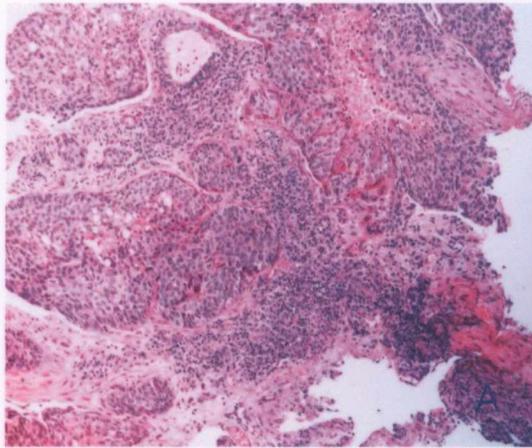
Tipo histológico (HE)	n (%) Diagnóstico inicial	n (%) Diagnóstico 2ª análise (HE)	n (%) Diagnóstico HE + IHQ
Carcinoma escamocelular	110 (45,1)	76 (31,1)	90 (36,9)
Adenocarcinoma	48 (19,7)	51 (20,9)	66 (27,0)
Carcinoma de pequenas células	31 (12,7)	32 (13,1)	29 (11,9)
Carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado	31(12,7)	10 (4,1)	1 (0,4)
Carcinoma não pequenas células pouco diferenciado	7 (2,9)	48 (19,7)	14 (5,7)
Neoplasia maligna indiferenciada	5 (2,0)	17 (7,0)	6 (2,4)
Sarcoma/ Linfoma	4 (1,6)	2 (0,8)	6 (2,4)
Tumor carcinóide	3 (1,2)	3 (1,2)	21(8,6)
Carcinoma de grandes células	2 (0,8)	0 (0)	1 (0,4)
Adenoma	2 (0,8)	0 (0)	0 (0)
Carcinoma bronquioloalveolar	1 (0,4)	5 (2,0)	2 (0,8)
Carcinoma adenoescamoso	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
Falta tecido tumoral	0 (0)	0 (0)	7 (2,9)
<b>TOTAL</b>	<b>244 (100)</b>	<b>244 (100)</b>	<b>244 (100)</b>

As figuras de 3 a 7 ilustram cada subtipo tumoral, bem como o painel imuno-histoquímico para definição histogenética e auxílio diagnóstico.

Figura 3: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Maciços de células epiteliais de tamanho médio e grande, atípicas, infiltrando francamente a lâmina própria da mucosa bronquiolar (HE, 100X). (B) Detalhe da foto anterior salientando o padrão pouco diferenciado do tipo celular neoplásico (HE, 400X). (C) Imunomarcção positiva para CK34 $\beta$ E12, multifocal, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (D) Imunomarcção fortemente positiva para CK5/6, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X).

**Diagnóstico final: Carcinoma escamocelular**

Nota: Marcadores negativos: CKAE1/AE3, CK8, CK7, CK20, SPA, TTF-1 e Cromogranina A.



Paraganglioma (Tumors of the Adipose Tissue).

Stains: Hematoxylin-eosin, IHC, CD117, CD56, S-100, and Chromogranin A.

Figura 4: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A e B) Maciços irregulares de células neoplásicas epiteliais muito atípicas infiltrando a lâmina própria de mucosa bronquiolar (HE, 400X). (C) Imunomarcação positiva para CKAE1/AE3, difuso, citoplasmático (EnVision™, 200X). (D) Imunomarcação positiva para CK7, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 400X). (E) Imunomarcação positiva para SPA, difuso, padrão citoplasmático (EnVision™, 200X). (F) Imunomarcação positiva para TTF-1, difuso, padrão nuclear (EnVision™, 400X).

**Diagnóstico final: Adenocarcinoma.**

Nota: Marcadores negativos: CK8, CK34βE12, CK20, CK5/6 e Cromogranina A

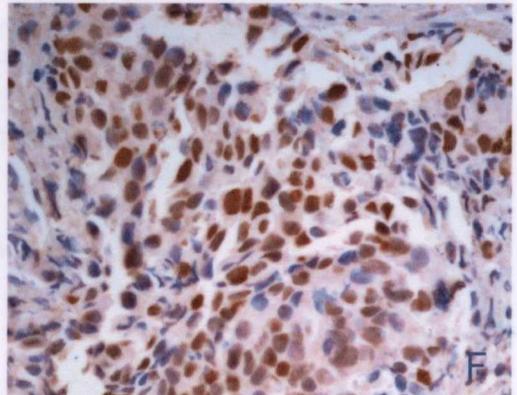
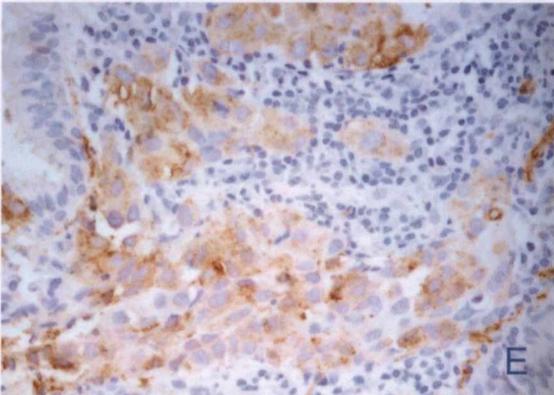
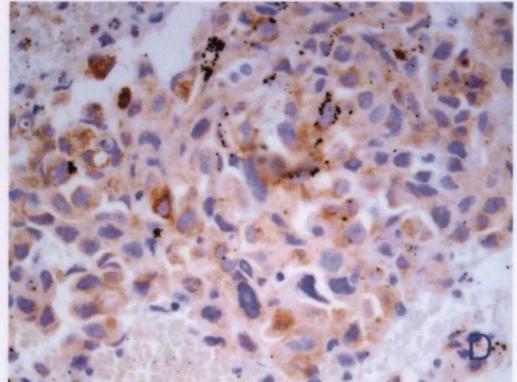
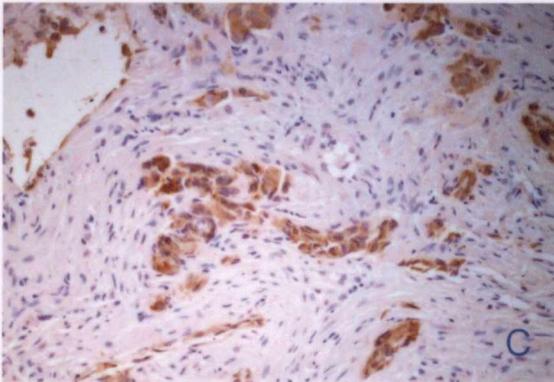
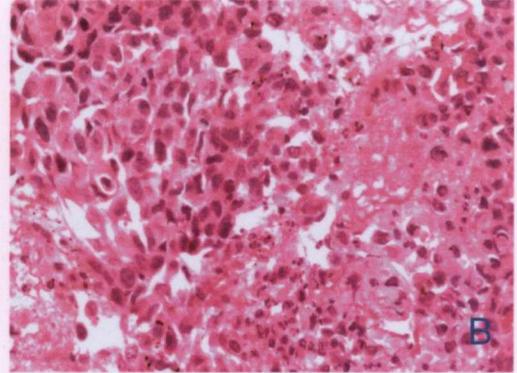
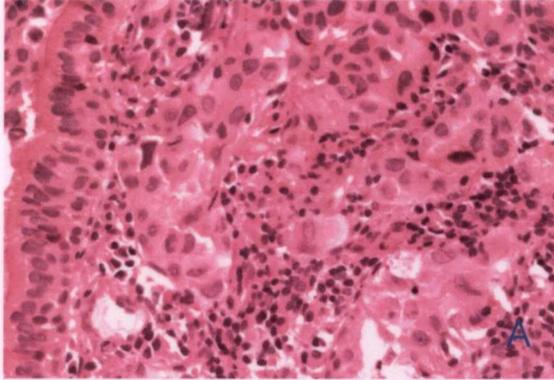


Figura 5: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Mucosa bronquiolar com metaplasia escamosa do epitélio de revestimento e, na lâmina própria, neoplasia infiltrante formada por maciços irregulares de células epiteliais (HE, 200X). (B) Detalhe da foto anterior mostrando atiplas nucleares e a variação do tamanho dos maciços tumorais (HE, 400x). (C) Detalhe do tipo celular neoplásico, salientando-se o citoplasma róseo relativamente evidente (HE, 400X). (D) Imunomarcção positiva para Cromogranina A no citoplasma das células tumorais, padrão granular (EnVision™, 400X).

**Diagnóstico final: Tumor carcinóide**

Nota: Marcadores negativos: CKAE1/AE3, CK8, CK34βE12, CK7, CK20, CK5/6, TTF-1 e SPA

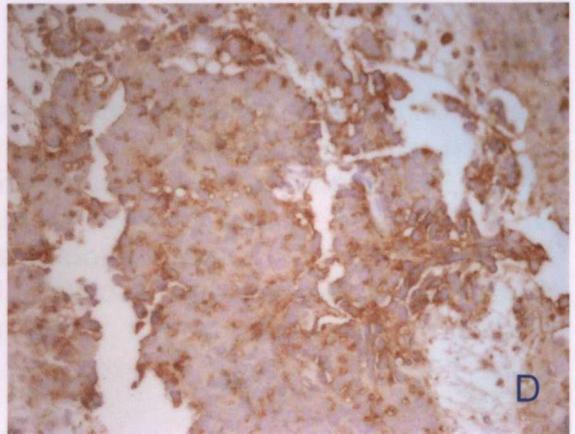
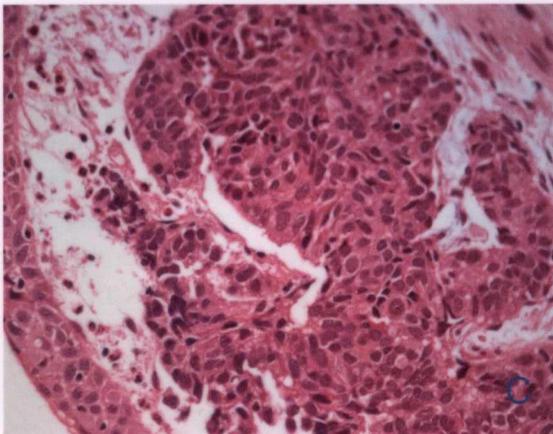
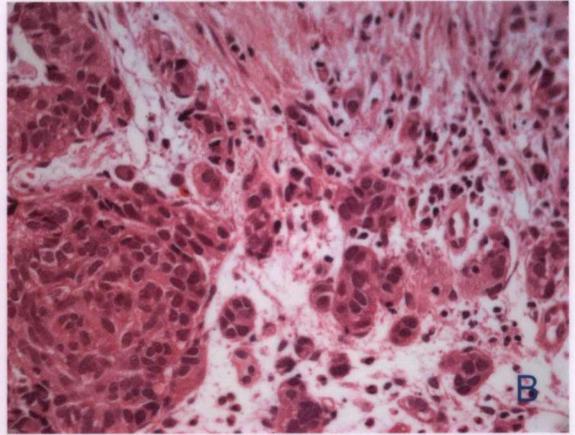
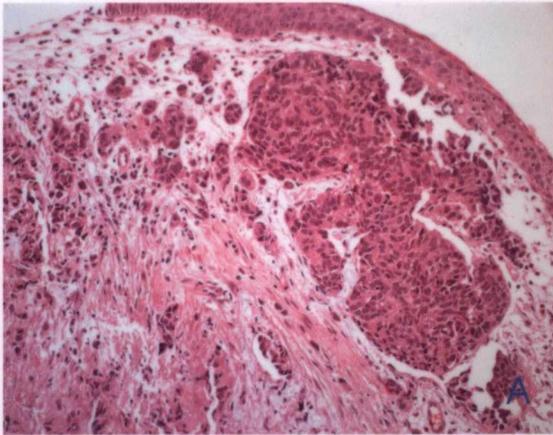


Figure 1: Histological sections of the tumor.

Figure 2: Immunohistochemical staining of the tumor for CK5/6, CK14, CK18, CK20, TTF-1, and p4.

Figura 6: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Mucosa bronquiolar exibindo células tumorais bastante atípicas, de tamanho médio e grande infiltrando a lâmina própria (HE, 400X). (B) Detalhe da foto anterior, salientando-se a atipia celular (HE, 400X). (C) Imunomarcação positiva para CK7, focal, citoplasmático (EnVision™, 400X). (D e E) Imunomarcação positiva para CK8, multifocal, citoplasmático (EnVision™, 400X). (F) Imunomarcação positiva para Cromogranina A, multifocal, citoplasmático (EnVision™, 400X).

**Diagnóstico final: Carcinoma anaplásico de grandes células neuroendócrino**

Nota: Marcadores negativos: CKAE1/AE3, CK34βE12, CK20, CK5/6, TTF-1 e SPA

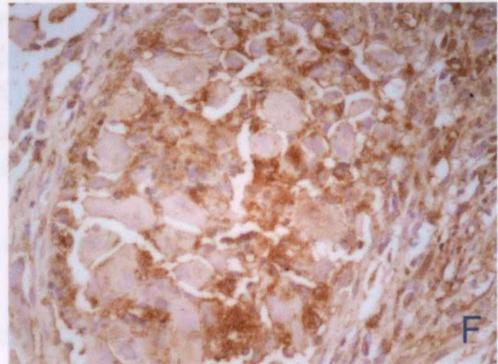
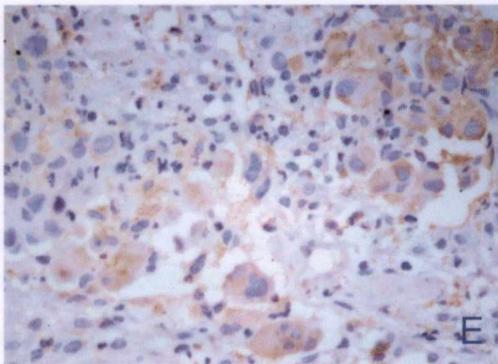
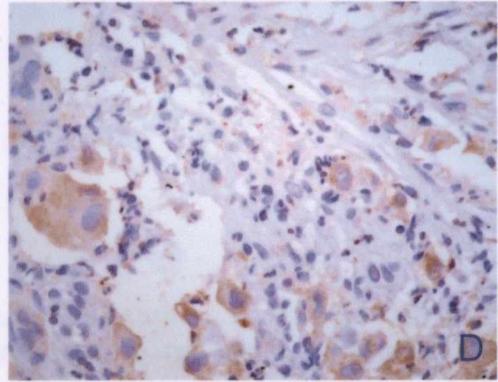
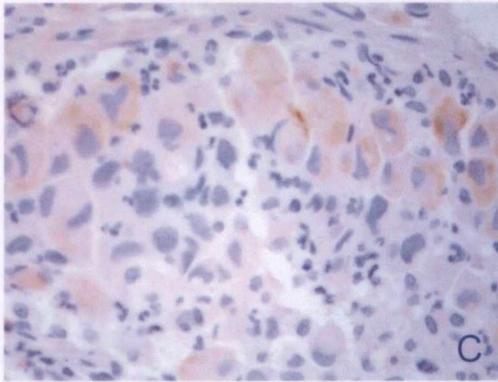
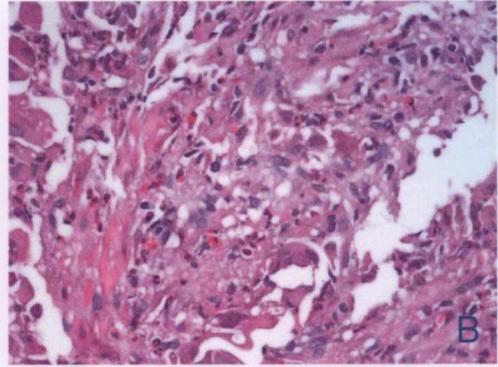
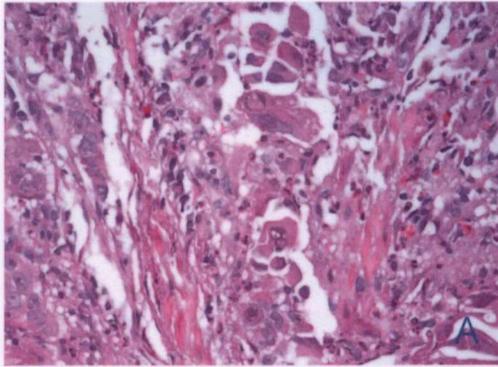
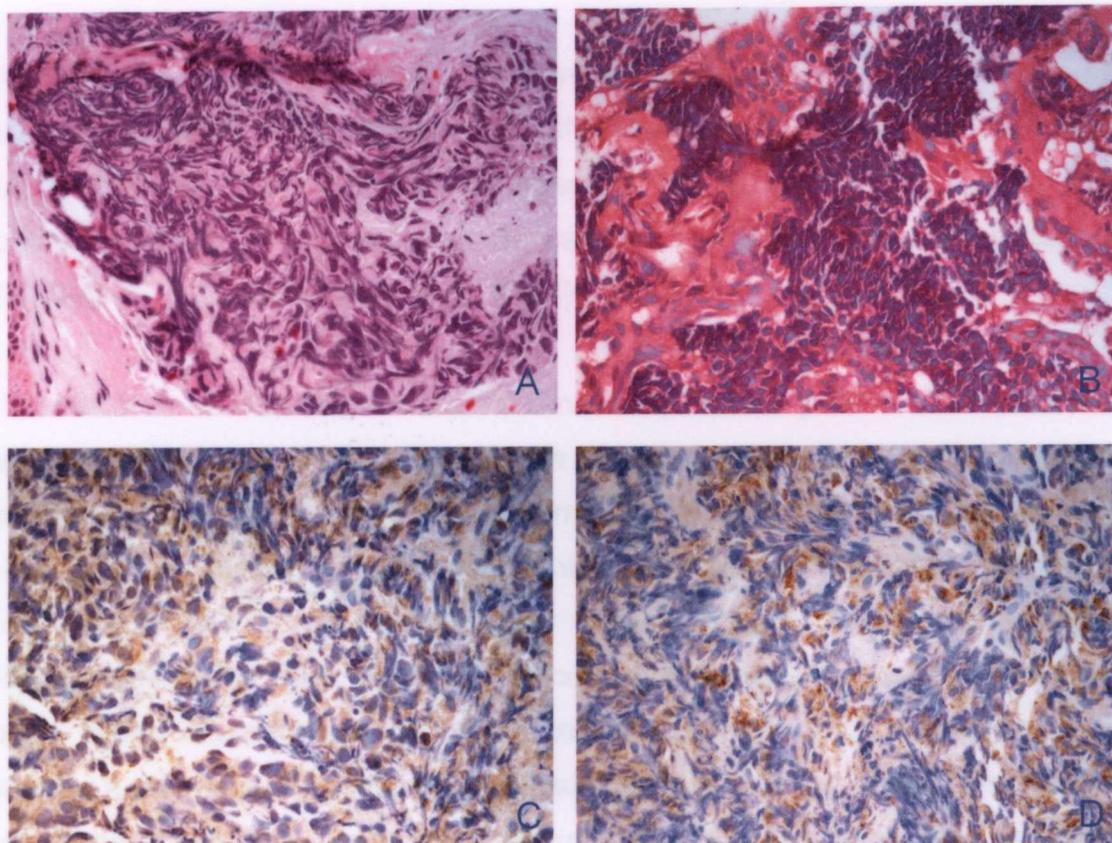


Figura 7: Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de algumas neoplasias pulmonares. (A) Mucosa bronquiolar exibindo na lâmina própria, infiltração neoplásica formada por maciços irregulares de células pequenas apresentando artefatos decorrentes de esmagamento tecidual (HE, 200X). (B) Visão panorâmica da neoplasia maligna de células pequenas infiltrando o tecido conjuntivo da mucosa (HE, 100X). (C) Imunomarcação positiva para CKAE1/AE3, multifocal, citoplasmático (EnVision™, 400X). (D) Imunomarcação positiva para Cromogranina A, multifocal, citoplasmático (EnVision™, 400X).

**Dianóstico final: Carcinoma anaplásico de pequenas células neuroendócrino**

Nota: Marcadores negativos: CK8, CK34βE12, CK5/6, CK7, CK20, SPA e TTF-1

Segundo Hwang (1994), a complexa morfologia do CP, com heterogeneidade e sua distribuição histopatológica decorrente da interação fisiopatológica entre múltiplos fatores e Organização Mundial de Saúde (OMS) possibilita sua classificação em tumores primários ou secundários, sendo esta essencialmente baseada em critérios morfológicos.



Segundo Travis et al. (1999) e Capelozzi (2001),

com estes dados disponíveis, nos propomos a fazer um estudo retrospectivo do CP, diagnosticados em áreas brônquicas e bilínguas transbrônquicas no Serviço de Histopatologia (SH) do Centro de Pesquisa Gastroenterologia (CPG) da UFPA, entre os períodos de 1988 a 2004, tendo como parâmetro de referência a unidade hospitalar do Estado e referência para diagnósticos de doenças neoplásicas locais.

Para isso, estudamos todos os casos de câncer de pulmão, confrontando-os com os diagnósticos locais. Aquelas em que não foi possível uma definição

## 6 DISCUSSÃO

Segundo Carey (1994), a complexa morfologia do CP, nem sempre permite a sua identificação histogenética diagnóstica através da análise histopatológica convencional, muito embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconize que a classificação dos tumores pode ser essencialmente baseada em critérios morfológicos.

Apesar do diagnóstico dos tipos comuns de carcinomas de pulmão não apresentar maiores complexidades, as dificuldades se apresentam nos casos poucos diferenciados ou no que diz respeito ao diagnóstico diferencial, nas situações advindas das combinações de padrões morfológicos de vários tumores (ALBERTI et al., 1986; MARSON et al., 2004).

Na tentativa de estabelecer critérios mais específicos para o reconhecimento dos tipos histológicos do CP, a pesquisa de diversos marcadores tumorais, a partir de técnica de imuno-histoquímica, pode permitir um diagnóstico histogenético rápido e mais preciso da neoplasia pulmonar, contribuindo para uma melhor avaliação e tratamento dos doentes acometidos por esta patologia. Mesmo levando em consideração as dificuldades técnicas e os custos operacionais, que limitam a ampla utilização desta metodologia na identificação histogenética tumoral, podemos acrescentar a esta análise, o fato de que, cada vez mais são solicitados diagnósticos precisos sobre quantidades cada vez menores de tecidos e o patologista está tendo que se adaptar a essas novas condições (TRAVIS et al., 1999; CAPELOZZI, 2001).

Sob estes aspectos considerados relevantes, nos propomos a fazer um estudo retrospectivo do CP, diagnosticados em biópsias brônquicas e biópsias transbrônquicas, no Serviço de Histopatologia (SH) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ/BAHIA), entre os períodos de 1986 a 2004, todas elas procedentes do HEOM, unidade hospitalar do Estado e referência para tratamento de doenças respiratórias/ torácicas.

Neste estudo, revisamos todos os casos de câncer de pulmão, confrontando-os com os diagnósticos iniciais. Aqueles em que não foi possível uma definição

histogenética clara, como nos poucos diferenciados ou indiferenciados, ou os que apresentaram combinações de padrões morfológicos, ou quando houve divergência com o diagnóstico inicial, submetemos esses casos à técnica de imuno-histoquímica.

O Serviço de Histopatologia (SH) recebeu no período citado, 25016 casos para exame anatomopatológico. Desses, 3,8% (n=956) corresponderam a doenças pulmonares e 1,2% (n=304) a neoplasias pulmonares. Os casos que apresentaram indisponibilidade e/ou exigüidade do material (0,13%; n=34) e as peças cirúrgicas (0,10%; n=26), foram excluídas do estudo. Portanto, nossa casuística consta de 244 casos, 88,9% (n= 217) foram encaminhados através de amostras colhidas por BB e 11,1% (n=27) colhidas como BTB. A nossa mostragem (BB e BTB) apresenta-se de acordo com os estudos de Lorenzoni, (2001); Zamboni, (2001) e Fernandez et al. (2002). Os autores comentam que o principal exame endoscópico para a avaliação diagnóstica de pacientes com câncer do pulmão, é a broncoscopia (rígida e flexível). Zamboni, (2001) e Soler et al. (2004) acrescentaram que a broncofibroscopia, associada à biópsias brônquica e transbrônquica, é capaz de revelar cerca de 70% dos carcinomas do pulmão.

No levantamento efetuado, nas fichas de registro dos pacientes, em relação as principais manifestações clínicas presentes, nossos resultados contemplam as informações contidas em apenas 62,3% dos casos (n=152). Esse fato mostra a dificuldade na avaliação de dados clínicos epidemiológicos em estudos retrospectivos.

Os sinais e sintomas apresentados no estudo como: hemoptise, dispnéia e a dor torácica, apresentam freqüências inferiores aos encontrados por Barros et al. (2006). Os autores comentam que na população com câncer de pulmão, a hemoptise é o sinal que está presente em 27 a 57%, a dispnéia em aproximadamente 37% e a dor torácica em 27 a 49%, para este sintoma, Jamnik et al., (2008) apontam uma freqüência bem mais elevada (60%).

Em relação a tosse, a freqüência encontrada está de acordo com os descritos por Barros et al. (2006) e que aparece como o mais comum (45 a 75%). Jamnik et al. (2008) relatam que este sinal é o de maior presença (80%), enquanto para Novaes

(2008) é um sinal inespecífico, embora em maior frequência, é comum em fumantes e em diferentes doenças respiratórias.

A literatura nos mostra que, os sintomas respiratórios no câncer de pulmão têm uma grande repercussão na qualidade de vida dos doentes, apesar de ser uma doença de evolução lenta, assintomática no início e tardiamente diagnosticada. Moreira et al. (1997), comentam que os tumores iniciais, não costumam produzir sinais/sintomas que justifiquem a investigação e quando esses são apresentados, geralmente evidenciam um mau prognóstico, tendo em vista o estágio avançado dos casos.

Nossos resultados, ainda em relação aos sinais e sintomas, seguem os comentários de Beckies et al. (2003). Para esses autores, os tumores de localização central, a exemplo dos carcinomas epidermóides e de pequenas células, geralmente provocam sinais como tosse, sibilos, roncos, hemoptise, dispnéia e sintomas como a dor torácica, causada por obstrução ou compressão do tumor. Acrescentando os comentários de Silva Jr et al. (2004), de que esses tumores são etiológicamente relacionados ao tabagismo, poluição e infecções brônquicas repetitivas, podemos caracterizar o risco de se desenvolver o câncer de pulmão através do tabagismo. Os nossos resultados apontam a presença de tabagismo em 40,1% (n=61) dos casos.

Porta et al. (1986) relatam que tumores de localização periférica, como os adenocarcinomas, geralmente são assintomáticos. Em nosso estudo, sua frequência foi de 19,7 % (n=48). Zamboni (2001) se refere ao aumento da incidência do adenocarcinoma como uma decorrência do tabagismo, especialmente de alterações na composição do cigarro, a exemplo dos menores teores de alcatrão e nicotina. Embora a associação com o tabagismo neste caso seja de menor importância, isso pode ser explicado, pelo fato da fumaça poder alcançar as porções mais periféricas dos pulmões, favorecendo o aumento da frequência deste tipo histológico.

Em nosso estudo, encontramos uma maior prevalência do câncer de pulmão entre indivíduos do sexo masculino, contribuindo com 66,4 % dos casos (n=162) e o feminino com 33,6 % (n=82) e a idade média do grupo estudado correspondeu a 59,5 anos. Os achados de Beckles et al. (2003) e Alberg e Samet (2003) apontam o

surgimento de tumores em torno de 60 anos de idade, com mais freqüência no sexo masculino e em grandes fumantes. De forma semelhante aos achados por Parente et al. (2007) que relatam uma freqüência elevada de câncer de pulmão em homens (81,8%) do que em mulheres (18,27%), sendo a média da idade de 64,5 e a ocorrência acontece em 70% de fumantes ou ex-fumantes.

A relação homem/mulher encontrada no estudo foi de 1,98, discretamente maior que a apontada pelo Instituto Nacional de Câncer (1,21) em 2008. Alberg e Samet (2003) citam que, esta relação no século passado era de 10:1. A este fato, podemos atribuir que o aumento da incidência nas mulheres é devido à mudança de hábitos, com a introdução do tabagismo neste grupo. De acordo com estas revisões e segundo Flanders et al. (2003), o consumo de cigarros, tornou-se o principal fator de risco para o câncer de pulmão, principalmente pela exposição e a inalação dos produtos carcinógenos contidos na fumaça, acrescentados a poluição tabagística ambiental.

A avaliação histológica em HE do nosso material é baseada na classificação da OMS (2004). Essa classificação divide as neoplasias com base na aparência histopatológica, formada por quatro grandes grupos: carcinomas de pequenas células, adenocarcinomas, carcinomas epidermóide ou escamocelular e carcinomas indiferenciados de grandes células. Geralmente os três últimos tipos são agrupados como carcinomas não pequenas células, segundo os estudos de Hirsch, (1989); Capelozzi, (2001); Zamboni, (2001); Carvalho, (2004); Silva Jr, (2004) e Rossi et al. (2004).

Acrescentamos também a esta avaliação, o uso da classificação utilizada na prática clínica, que segundo Zamboni (2001), classifica os carcinomas broncogênicos sob a ótica da abordagem terapêutica, estadiamento e tratamento. Carvalho (2004) e Rossi et al. (2004) comentam, que a classificação clínica, apesar de simples, é aceitável, é adequada para a conduta terapêutica do paciente. Essa classificação divide as neoplasias de pulmão em dois grupos histológicos, de diferentes comportamentos biológicos e prognósticos: carcinoma de pulmão não pequenas células (CPNPC) e carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC).

Esse último tipo histológico, quando diagnosticado, implica no tratamento quimioterápico imediato.

Nossos achados na 1ª avaliação em HE classificaram 75% (n=183) dos casos quanto a diferenciação histológica, assim distribuídos: bem diferenciados, 7,1%, (n=13); moderadamente diferenciados, 26,8% (n=49); pouco diferenciados, 50,8% (n=93) e 15,3% (n=28), anaplásicos (Tabela 7).

Percebe-se um percentual significativo de CEC pouco diferenciado e de adenocarcinoma pouco diferenciado diagnosticados, tanto na 1ª como na 2ª análises. Este fato pode trazer dificuldades para a definição histogenética dessas neoplasias, baseada apenas no HE. Este aspecto é reforçado pela presença de 13,9% de CEC e de 7,9% de casos de difícil avaliação histogenética com tais diagnósticos e que foram submetidos ao estudo IHQ (Tabela 7).

Na 2ª avaliação dos tumores em HE, quanto a diferenciação histológica, foram revelados 92,2% (n=225) dos casos, com as seguintes freqüências: bem diferenciados, 9,3%, (n=21); moderadamente diferenciados, 13,8% (n=31); pouco diferenciados, 54,7% (n=123) e anaplásicos, 22,2% (n=50) (Tabela 7).

Verifica-se, em ambas avaliações, a alta freqüência de tumores pouco diferenciados ou anaplásicos, trazendo dificuldades para a definição histogenética neoplásica.

Ao analisarmos os resultados da 1ª avaliação em HE, em relação a definição histogenética dos carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados, observamos a freqüência de 17,6% (n=43), enquanto que na 2ª avaliação em HE, este valor foi de 30,7% (n=75), para esses tumores (Tabela 7).

Percebe-se, então, um aumento de 13,1% (n=32) no diagnóstico de carcinoma pouco diferenciado/ indiferenciado. Esse fato, talvez sugira, uma aplicação mais uniforme e precisa dos critérios morfológicos no diagnóstico dos tumores na 2ª avaliação, o que foi realizado por um único patologista. Na primeira análise, vários patologistas estiveram envolvidos.

Uma outra razão para essa discordância entre a 1ª e a 2ª análise, é que nos casos mais antigos, quando ainda não havia disponibilidade da imuno-histoquímica, existia uma maior tendência dos patologistas para definir os tipos histológicos no HE ou quando muito, com alguma coloração especial para muco.

Como parte do estudo coube a comparação entre a análise inicial em HE e a análise do presente estudo, segundo os critérios da OMS (2004). Calculamos o índice Kappa de Concordância e o valor encontrado de 0,2571 correspondeu a uma concordância leve. A discordância ocorreu principalmente nos grupos dos carcinomas escamocelulares em 46,6% (n=41); adenocarcinomas em 13,6% (n=12); carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados em 28,4% (n=25) e em outras neoplasias, 11,4% (n=10) (Tabela 8).

Isto pode significar que, na rotina diagnóstica, um percentual significativo dos casos pode oferecer dificuldade para o diagnóstico preciso, sendo importante à realização da IHQ. Reconhecemos, então, a necessidade da realização de um diagnóstico, mais preciso, através da aplicação de marcadores imuno-histoquímicos. Ressaltamos que, de acordo com a literatura, a ausência de uma identificação histogenética tumoral clara é decorrente do grau de pouca diferenciação ou indiferenciação. Esta dificuldade pode também estar relacionada ao tamanho limitado da amostra (Rossi et al., 2004), concordando com os estudos de Oliveira (2002), Silva Jr (2006) e Bahrami et al. (2008) sobre os diagnósticos dos tumores indiferenciados ou pouco diferenciados. Além disso, pequenas amostras de tecidos limitadas por artefatos de esmagamento são difíceis para avaliação diagnóstica na forma convencional e que pode induzir a erros de interpretação diagnóstica.

Motivados por essas dificuldades, decorrentes da interpretação dos tumores pouco diferenciados ou naqueles com sobreposição de características morfológicas de diversos tumores e, ainda nos indiferenciados, nos propusemos ao estudo imuno-histoquímico desses casos em especial. De acordo com os estudos de Jagirdar (2008), Beasley (2008) e Sica (2008), o emprego da referida técnica pode colaborar na separação de Carcinoma de pequenas células (CPC), Carcinoma não pequenas

células (CNPC) e Carcinóide, particularmente em biópsias com amostras pequenas e limitadas por artefatos.

Selecionamos da nossa casuística, 41,4% (n=101) tumores, para a análise imuno-histoquímica. Nessa amostragem, incluímos os casos de divergência entre a 1° e o 2° diagnósticos no HE em 61,4% (n=62) e aos casos de difícil definição histogenética através de análise convencional em HE, considerando os pouco diferenciados ou indiferenciados em 38,6% (n=39). Essa nova amostragem é composta de 66,3% (n=67) de tumores definidos como carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados. Os demais 33,7% (n=34) correspondem aos casos difíceis para definição no HE com suspeitas diagnósticas de outras neoplasias.

Para o diagnóstico diferencial dessas neoplasias pulmonares, elegemos um painel imuno-histoquímico mínimo, composto pelos seguintes marcadores: *CK AE1/AE3, CK 8, CK 34 βE12, CK 5/6, CK 20, CK 7, SPA, TTF-1 e Cromogranina A*. Esse painel mínimo tem poder para identificar a grande maioria das neoplasias primárias de pulmão, distinguir carcinomas neuroendócrinos de outros tipos de carcinomas, e também de identificar neoplasia pulmonar metastática.

A escolha do painel imuno-histoquímico mínimo, baseou-se nas características peculiares dos marcadores antigênicos em diagnosticar os tipos mais prevalentes de câncer de pulmão relatados na literatura, tendo em vista a sua aplicação dentro da nossa realidade diagnóstica, conforme Tabela 2.

A IHQ possibilitou definir histogeneticamente, 93,1% (n=94) dos 101 casos. Deixaram de ser avaliados 6,9% (n=7) desses casos, por ausência de tecido tumoral nas secções. Assim, o estudo imuno-histoquímico não pode ser realizado, nos casos indicados, por falta de material nos blocos parafinizados. Os resultados desta análise apontam, 71,3% (n=72) casos discordantes, sendo 61,4% (n=62) pertencentes aos carcinomas pouco diferenciados/ indiferenciados e 9,9% (n=10) de outras neoplasias.

Percebe-se que dos 101 tumores indicados para a IHQ, 93,1 % (n=94) tiveram uma definição histogenética. Esse desempenho demonstra muito bem a importância da IHQ na definição histogenética tumoral, especialmente no câncer de pulmão.

Em relação aos tumores considerados como carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados (carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado, neoplasia indiferenciada) e utilizando a classificação OMS, 2004, a aplicação do painel de anticorpos, foi capaz de reclassificar histogeneticamente, 92,5% (n=62) dessas neoplasias. Manteve-se a classificação de carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado em 11,3 (n=7) desses tumores. A avaliação ficou prejudicada por falta de tecido tumoral em 7,5% (n=5) dos casos (Figura 4).

O painel imuno-histoquímico utilizado é capaz de discernir as neoplasias pulmonares primárias de possíveis tumores metastáticos para pulmão, especialmente pela avaliação conjugada das várias citoqueratinas utilizadas e pela presença no painel de alguns marcadores mais específicos de câncer de pulmão. Por outro lado, houve uma tentativa importante dos médicos clínicos de fazer uma correlação clínico-laboratorial e de dados de imagem, com os aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos no sentido de afastar a possibilidade de neoplasias metastáticas.

A análise dos vários marcadores utilizados na IHQ, verificados nos principais tipos tumorais de CP, mostrou resultados interessantes. Faremos uma breve avaliação das situações mais importantes e frequentes, em relação aos tipos neoplásicos.

**CARCINOMA ESCAMOCELULAR**, em nosso estudo, a marcação de maior expressão se deu para a citoqueratina CK 34 $\beta$ E12, 90% (27/30); seguida da CK AE1/AE3 e CK 5/6, 56,67% (17/30); para CK 8, 16,7% (5/30) e para CK 7 e Cromogranina A, 3,33% (1/30). Não foi observada marcação para TTF-1, como descreve Rossi et al. (2004).

- A marcação observada para CK 5/6, está de acordo com a literatura. Segundo Marson et al. (2004) esta citoqueratina, é um marcador sensível e específico para carcinoma escamoso de pulmão, além de ser considerada como um dos marcadores específicos para mesotelioma. Hammar (2006) comenta que sua positividade em carcinoma escamocelular atinge mais de 90%.
- A marcação para CK 34βE12, observada em nossos resultado, é concordante com os comentários de Brambilla (2002); Rossi et al. (2004) e Hammar (2006). Os autores comentam que sua expressão é restrita principalmente a carcinomas escamosos e carcinomas basalóides, podendo em cerca de 10%, não apresentar reatividade.
- O baixo percentual de positividade para CK 8 (16,7%) em nosso material, está condizente com o que é visto na literatura, pois, tal marcador, tende a ser negativo no carcinoma escamocelular.
- A marcação para CK 7, embora seja uma citoqueratina localizada em epitélio do pulmão e mama, geralmente é negativa para carcinoma escamocelular de pulmão e conforme citado na literatura, apresenta baixa reatividade. Beasley (2008) comenta, que os CEC são tipicamente negativos para CK 7 e CK 20, embora um pequeno número de casos pode ser positivo para CK 7. Em nosso estudo, somente 1 caso apresentou marcação para CK 7 (3,3%), aspecto similar ao encontrado na literatura (HAMMAR, 2006).
- A não marcação para TTF-1 está de acordo com o descrito por Rossi et al. (2004), Hammar (2006), não sendo encontrado em carcinoma escamocelular, ou de acordo com outras séries, pode ser positivo em cerca de 26% dos CEC (HAMMAR, 2006).

**ADENOCARCINOMA**, nossos resultados apontam marcação para CK AE1/AE3 e CK 7, em 71,4% (15/21); para CK 8 em 57,1% (12/21), para CK 34βE12 e SPA em 19,0% (4/21), para TTF-1 em 4,8% (1/21). Não foram observadas marcações para CK 20, CK 5/6 e Cromogranina A.

- A fenotipagem *CK 7/20* de adenocarcinomas é uma ferramenta útil de diagnóstico. A freqüente reatividade para *CK 7* (71,4%), bem como a não marcação para *CK 20*, está de acordo com Su et al. (2006) e Park et al. (2007) quando se referem a estes dois marcadores para diferenciação de tumores primários pulmonares, a exemplo do adenocarcinoma. Zou et al. (2003) utilizaram um painel formado pelos anticorpos TTF-1, SP-B, *CK 7* e *CK 20* para discriminação entre adenocarcinomas de pulmão primário (n=42) e metastático (n=30) e obtiveram positividade para *CK 7* em todos os adenocarcinomas pulmonares primários. A imunomarcação positiva e a especificidade da combinação *CK 7/CK 20* em discriminar entre adenocarcinoma primário e metastático foram respectivamente 79% e 94%. Chu et al. (2000) se referem a marcação *CK 7<sup>+</sup>/CK 20<sup>-</sup>* em adenocarcinomas de pulmão e *CK 7<sup>-</sup>/CK 20<sup>+</sup>* a adenocarcinomas metastático.
  
- A expressão de *CK 34βE12* é restrita principalmente a carcinomas escamosos e carcinomas basalóides. Adenocarcinomas e carcinomas neuroendócrinos de alto grau são tipicamente negativos, o que está refletido na baixa reatividade apresentada em nosso material (19,0%). Embora o marcador *CK 34βE12* se apresente negativo na maioria dos adenocarcinomas, a literatura mostra que em cerca de 50% é reativo (HAMMAR, 2006).
  
- O marcador *TTF-1*, *fator de transcrição da tireóide (TTF-1)*, é sensível e específico, com especificidade maior para carcinoma do pulmão, carcinomas neuroendócrinos ou não. Rossi et al. (2004) relatam que em tumores pulmonares, o marcador *TTF-1* é essencialmente expresso em adenocarcinomas, em tumores neuroendócrinos de grandes células e em carcinomas de pequenas células, não sendo encontrado em carcinoma escamocelular. No nosso material, chama atenção, a baixa expressão de *TTF-1* em adenocarcinomas (4,8%), enquanto que na literatura, a freqüência de positividade, oscila entre 50-70% (HAMMAR, 2006). É possível que, este antígeno tenha sofrido alteração nos seus sítios de reação durante a fixação e arquivamento prolongado.

- O marcador CK 5/6 é usado no diagnóstico diferencial entre carcinoma escamoso pouco diferenciado e adenocarcinoma, expressa positividade em mesoteliomas, carcinoma de células transicionais, diferentemente de adenocarcinomas (ORDONEZ, 1998; TOT, 2001 e MARSON et al., 2004). Ordonez, (1998) e Tot (2001), demonstraram a aplicação desse marcador, no diagnóstico diferencial entre mesoteliomas pleurais e adenocarcinomas metastáticos de pleura. A positividade se deu em todos os casos de mesotelioma e carcinoma escamocelular de pulmão. Os carcinomas metastáticos de pulmão, carcinomas pouco diferenciados, também expressaram CK 5/6 de forma focal ou fracamente, não havendo marcação nos casos de adenocarcinomas, como é demonstrado também em nossos resultados, onde tal marcador foi negativo (COHEN et al., 1997).
- O marcador SPA, apresenta uma baixa reatividade, apesar da alta especificidade e moderada sensibilidade para distinção entre tumores primários e secundários de pulmão. De acordo com Beasley (2008), pode ser um marcador específico para adenocarcinoma de pulmão, chegando até a 50% de positividade, porém não tem a sensibilidade de um outro marcador, o TTF-1. No nosso material, a positividade para SPA, foi baixa nos adenocarcinomas (19,0%). A dificuldade no uso do SPA, está no fato da sua sensibilidade ser em torno de 63% nas neoplasias malignas primárias de pulmão, pode apresentar positividade de 46% nos carcinomas pulmonares metastáticos, incluindo o carcinoma de mama (JAGIRDAR, 2008).

**CARCINOMA ADENOESCAMOSO**, em nosso estudo, só tivemos um caso desse tipo de neoplasia. Observamos imunorreatividade para os marcadores, CK AE<sub>1</sub>/AE3, CK 8, CK 34 $\beta$  E12, CK 7 e SPA, não reagindo para CK 20, CK 5/6, Cromogranina A e TTF-1. Tais resultados são similares aos relatados nos poucos trabalhos sobre esse tipo específico de tumor pulmonar (HAMMAR, 2006).

## TUMORES NEUROENDÓCRINOS

Segundo Beasley (2008) e a OMS (2004), os tumores neuroendócrinos de pulmão, incluem os carcinóides, carcinomas neuroendócrinos de grandes células e carcinomas de pequenas células. As freqüências, apresentadas em nossos resultados serão demonstradas a seguir:

a) *CARCINOMAS NEUROENDÓCRINO DE PEQUENAS CÉLULAS*, apresentaram marcação para *CK AE1/AE3* e *Chromogranin A*, em 42,9% (3/7), 28,6% (2/7) para *CK 8* e para os demais não houve marcação.

b) *TUMORES CARCINÓIDES*, marcaram para *Chromogranin A*, em 84,2%(16/19), para *CK 8* em 42,1% (8/19), para *CK AE1/AE3*, em 21,1% (4/19), para *CK 34β E12*, em 36,8% (7/19) e para *CK 7* em 15,8% (3/19), para *CK 5/6* , em 10,5%. Não foram observadas marcações para TTF-1 e SPA.

c) *CARCINOMAS NEUROENDÓCRINO DE GRANDES CÉLULAS*, neste único caso do estudo, só houve marcação para *Chromogranin A*, *CK7* e *CK8*.

Os tumores neuroendócrinos de pequenas células, freqüentemente são positivos para citoqueratinas de baixo peso molecular e são negativos para citoqueratinas de alto peso molecular. Os marcadores neuroendócrinos, sinaptofisina e NSE são positivos em 100% dos casos e o TTF-1, é positivo em cerca de 90-95%. Quanto a cromogranina, sua positividade pode variar a depender da quantidade de grânulos neuroendócrinos presentes e oscila entre 25-30% (HAMMAR, 2006).

Em relação aos tumores neuroendócrinos de grandes células, o marcador TTF-1 foi negativo no nosso único caso. Analisando este marcador neste tumor, Rossi et al. (2004) se referem a uma tendência para a negatividade; por outro lado, outros dados da literatura mostram que tal marcador pode ser positivo em torno de 60-65% do Carcinoma neuroendócrino de grandes células (HAMMAR, 2006).

Em relação à marcação da cromogranina, nosso resultado é concordante com o citado por Hirisch (2000), em relação ao carcinoma de pulmão de pequenas células, como seu elevado potencial na produção de múltiplos marcadores endócrinos como a Chromogranin A, Synaptofisin, NSE. Ainda referindo -se aos

marcadores neuroendócrinos, Barra (2006), comenta que sua presença em neoplasias epiteliais são características dos carcinomas neuroendócrinos independente do sítio anatômico.

Beasley (2008), comenta que os tumores carcinóides, se caracterizam por expressar marcadores neuroendócrinos como a Chromogranin A, Synaptophysin e CD56 (NCAM). São tipicamente negativos para CK7 e CK20, porém, uma minoria pode ser CK 7 positivo e raros CK 20 positivos. As citoqueratinas têm uso limitado para este grupo de tumores. TTF-1 cora mais em carcinoma de pequenas células e carcinoma neuroendócrino de grandes células, enquanto é negativo para a maioria dos tumores carcinóides.

Em relação aos nossos casos, os tumores carcinóides exibiram resultados similares aos da literatura, considerando-se os marcadores cromogranina e TTF-1.

Analisando-se os marcadores *CK AE1/AE3*, *CK 7*, *CK 8* e *CK 34 $\beta$  E12*, os nossos percentuais de positividade, foram menores. Chama atenção em nossos resultados, a positividade do tumor carcinóide para a *CK 20* em um caso (5,3%). Esse fato pode acontecer, muito raramente, como citado por Beasley (2008). Isso pode ser explicado pela desrepressão gênica que ocorre nas neoplasias, favorecendo a ativação anômala de genes usuais.

Os marcadores selecionados para o painel IHQ em nosso estudo, tanto os marcadores epiteliais como os neuroendócrinos, foram de grande utilidade no diagnóstico diferencial de tumores pulmonares. Salientamos o potencial deste painel na definição de tumores neuroendócrinos (Tabelas 13, 14 e 15).

A análise da Tabela 14 mostra que, quando todos os resultados da nossa amostra foram comparados em relação à concordância diagnóstica após a IHQ, houve uma concordância diagnóstica positiva em 72,5% dos casos e negativa em 27,5% das amostras examinadas. Esses dados mostram um desempenho diagnóstico melhor (concordância diagnóstica positiva) com a IHQ, quando comparado com os mesmos dados, mas sem a aplicação da IHQ (Tabela 9).

Por outro lado, estudando-se apenas os 101 casos encaminhados para a IHQ, percebe-se uma discordância diagnóstica em 71,3% dos casos e uma concordância

positiva em apenas 28,7% do material (Tabela 13), enfatizando a importância da IHQ, na definição histogenética tumoral das neoplasias pulmonares.

Analisando a tabela 15, que trata da frequência geral dos tipos histológicos dos tumores pulmonares, analisados no presente estudo, percebe-se que a distribuição dos tipos histológicos é similar ao que ocorre em outras partes do Brasil e do mundo. A única exceção refere-se aos tumores carcinóides que na nossa casuística esteve presente com uma frequência de 8,6%. Esse número é cerca de 4 vezes maior ao que é citado na literatura de um modo geral. A explicação para isto, é que a nossa casuística não representa a prevalência geral dos tipos histológicos dos tumores de pulmão no estado da Bahia, uma vez que os casos analisados foram previamente selecionados e procede de um hospital referência em doenças torácicas.

Nossos resultados, como descritos na literatura, demonstram a necessidade de uma outra ferramenta que auxilie na definição mais precisa do tipo de neoplasia pulmonar, visto que, cada subtipo histológico pode possuir conduta diferenciada de tratamento e acompanhamento. Entretanto, não significa que a imuno-histoquímica deva substituir a análise morfológica convencional, como o principal fator para a classificação desses tumores.

Pensamos que a imuno-histoquímica pode ajudar a confirmar uma tendência morfológica ou beneficiar em alguns casos, uma morfologia limitada para um diagnóstico diferencial. O diagnóstico preciso e rigoroso de uma neoplasia de pulmão pode ser um processo complexo, e a imuno-histoquímica pode não abordar todas as circunstâncias daí, não substituir a análise morfológica convencional no HE.

## 7 CONCLUSÕES

- A imuno-histoquímica é um bom método complementar para o diagnóstico do câncer de pulmão.
- O painel mínimo de marcadores antigênicos constituídos por CKAE1/AE3, CK8, CK34βE12, CK7, CK20, TTF-1, CROMOGRANINA A e SPA foi capaz de definir histogeneticamente 93,1% dos casos submetidos a imuno-histoquímica; 6,9% desses casos não puderam ser especificamente classificados histologicamente, permanecendo como carcinomas pouco diferenciados.
- A frequência geral dos casos de câncer pulmonar diagnosticados no material do presente estudo (244 casos) foi carcinoma escamocelular, 36,9%; adenocarcinoma, 27%; carcinoma neuroendócrino de pequenas células, 11,9%; tumor carcinóide, 8,6%; carcinoma não pequenas células pouco diferenciado, 5,7%; neoplasia maligna indiferenciada, 2,4%; linfoma/sarcoma, 2,4%; carcinoma bronquioloalveolar, 0,8%; carcinoma neuroendócrino de grandes células, 0,4%; carcinoma pouco diferenciado/indiferenciado, 0,4%; carcinoma adenoescamoso, 0,4%; 2,9% dos casos não puderam ser analisados pela imuno-histoquímica devido a ausência de tecidos nas lâminas(exigüidade de material).
- Nossos resultados, como descritos na literatura, demonstram a necessidade de uma ferramenta como a imuno-histoquímica, que auxilie na definição mais precisa do tipo de neoplasia pulmonar, visto que, cada subtipo histológico pode possuir conduta diferenciada de tratamento e acompanhamento.
- A imuno-histoquímica pode ajudar a confirmar uma tendência morfológica ou beneficiar em alguns casos, uma morfologia limitada para um diagnóstico diferencial. O diagnóstico preciso e rigoroso de uma neoplasia de pulmão pode ser um processo complexo, e a imuno-histoquímica pode não abordar todas as circunstâncias daí, não substituir a análise morfológica convencional no HE.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTI, O.; CAPELOZZI, V.D.; SALDIVA, P.H. Large cell carcinoma of the lung. Ultrastructural and immunohistochemical features. **Chest**, v. 90, p. 524-527, 1986.
- ALBERG, A.J.; FORD, J.G.; SAMET, J.M. Epidemiology of Lung Cancer ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd edition) Supplement Diagnosis and Management of Lung Cancer: Accp Guidelines. **Chest** , v. 132, p.29S–55S, 2007.
- ALBERG, A.J.; SAMET, J. M. Epidemiology of lung cancer. **Chest** , v. 123, p. 21S-49S, 2003. Suplemento.
- ALMEIDA JR, H.L. Citoqueratinas/Cytokeratins.Educação Médica Continuada/Continuing Medical Education. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 135-145, mar./abr. 2004.
- ALVES, V.A.F. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. In: ALVES, V. F. A.; BACCHI C. J. **Manual de Imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia**, cap.1, p.1-9, 1999.
- AHMEDIN J.A, SIEGAL, R.; WAND, E.; MURRAY, T.; XU J; THUN, M.J. Cancer statistics 2007. **CA. Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n.1, p. 43-66, 2007.
- BARBOZA, C. E. G.; WINTER, D. H.; SEISCENTO, M.; SANTOS, U. P.; TERRA FILHO, M. Tuberculose e silicose: epidemiologia, diagnóstico e quimioprofilaxia. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. **J. Bras Pneumol.**, v. 34, n. 11, p. 959-966, 2008.
- BAHRAMI A; TRUONG L. D; RO J Y. Undifferentiation Tumor. True identity by Immunohistochemistry. **Arch. Pathol. Lab.Med.**, v.132, p. 324-348, 2008.
- BARRA, M. B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. The use of immunohistochemistry: indications and limitations. Procedimentos Médicos. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2, p. 173-184, abr./jun, 2006.
- BARROS, J.A; VALLADARES, G.; FARIA, A. R.; FUGITA, E. M.; RUIZ, A. P.; VIANNA, A. G. D.; TREVISAN, G. L.; OLIVEIRA, F. A. M. Diagnóstico precoce do câncer de pulmão: o grande desafio. Variáveis epidemiológicas e clínicas, estadiamento e tratamento. Early diagnosis of lung cancer: the great challenge. Epidemiological variables, clinical variables, staging and treatment. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 3, p. 221-227, 2006.
- BECKLES, M.A.; SPIRO, S.G.; COLICE, G. L.; RUDD, R. M. Initial evaluation of the patient with lung cancer. **Chest**, v. 123, (Suppl. 1), p. 97S-104S, 2003.
- BEASLEY, B.M. Immunohistochemistry of Pulmonary and Pleural Neoplasia. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 132, p. 1062–1072, 2008.

BRAMBILLA, E.; TRAVIS, W.T.; COLBY, T. V.; CORRIN, B.; SHIMOSATO, Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. **Eur. Respir. Journal**, v. 18, p. 1059–1068, 2001.

BRAMBILLA E. Classification des cancers broncho-pulmonaires (OMS 1999) **Rev. Mal. Respir.**, v. 19, p. 455-466, 2002.

BROERS J. L.V.; CARNEY, D.N.; LEYJ, L.; VOOIJS, G.P.; RAMAEKERS, F.C.S. Differential expression of intermediate filament proteins distinguishes classic from variant small-cell lung cancer cell lines. **Cell Biology Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 4409-4413, jul. 1985.

BROERS, J.L.V.; CARNEY, D.N.; ROT, M.K.; LANE, G.S.E.B.; VOOIJS, G.P.; RAMAEKERS, F.C.S. Intermediate Filament Proteins In Classic and Variant Types Of Small Cell Lung Carcinoma Cell Lines: A Biochemical and Immunochemical Analysis Using a Panel of Monoclonal and Polyclonal Antibodies **J. Cell Sci.**, v. 83, p. 37-60. 1986.

BROERS, J.L.V.; ROT, M.K.; OOSTENDORP, T.; HUYSMANS, A.; WAGENAAR, S. S.; WIERSMA-VAN, T.A.J.M.; VOOIJS, G. P.; RAMAEKERS, F.C.S. Immunocytochemical Detection of Human Lung Cancer Heterogeneity Using Antibodies to Epithelial, Neuronal, and Neuroendocrine Antigens. **Cancer Res.**, v. 47, p. 3225-3234, jun. 1987.

BROERS, J.L.V.; RAMAEKERS, F.C.S.; ROT, M.K.; OOSTENDORP, T.; HUYSMANS, A.; VAN MUIJEN, G.N.P.; WAGENAAR, S. S.; VOOIJS, G.P. Cytokeratins in Different Types of Human Lung Cancer as Monitored by Chain-specific Monoclonal Antibodies. **Cancer Res.**, v. 48, p. 3221-3229, jun. 1988.

BROERS, J.L.V.; ROT, M.K.; OOSTENDORP, T.; BEPLER, G.; LEYJ, L.; CARNEY, D.N.; VOOIJS, G.P.; RAMAEKERS, F.C.S. Spontaneous changes in intermediate filament protein expression patterns in lung cancer cell lines. **J. Cell Sci.**, v. 91, p. 91-108, 1988.

BUGALHO, A.; DORIS, M.; HAMACHER, J.; EBERHARDT, R.; HERTH, F.J. Ecoendoscopia brônquica: Aspectos práticos e aplicabilidade clínica. Endobronchial ultrasound: Practical aspects and clinical applications. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, 55, v.xiv, n.1, Janeiro/Fevereiro, 2008.

CAGLE, P. T. Chapter 17: Carcinoma of the lung. Thurlbeck's Pathology of the lung. CHURG, A. M.; MYERS, J. L.; TAZELAAR, H. D.; WRIGHT, J. L., third ed, 1995

CARNEY D. N. Recent Advances in the Biology of Small Cell Lung Cancer. **Chest**, v. 89, n.4, p. 253S-257S, april, 1986.

CAREY, F. A. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. **J. Pathol.**, v. 172, p.307-312, 1994.

CAPELOZZI, V.L.; ALBERTI, O.; SALDIVA, P.H. Large cell carcinoma of the lung. Ultrastructural and immunohistochemical features, **Chest**, v.90, p. 524-527, 1986.

CAPELOZZI, V. L. Câncer de Pulmão: avanços na definição histopatológica. **Jornal de Pneumologia**, v. 24, n. 5, p. 322-330, 1998.

CAPELOZZI, V. D. Palestra apresentada no Simpósio de Atualização do Hospital A. C. Camargo. São Paulo, 2001.

CAPELOZZI V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **J. Pneumol.**, v. 27, n. 6, nov./dez, 2001.

CAPELOZZI, V. L.; AB'SABER, A.M.; SILVA, A.G.P.; GALLO, C.P.; BRANDÃO, F. Requisitos mínimos para o laudo de anatomia patológica em câncer de pulmão: justificativas na patogênese. **J. Pneumol.**, v. 28, n. 4, jul./ago. 2002.

CAPELOZZI, V. D.; ZAMBONI, M.; CARVALHO. W. R. Avaliação Patológica do Câncer do Pulmão. **Câncer do Pulmão**, v. 4, p. 47-68, 2005.

CARAZZAI, E.H.; ANDREOSI, M.; GONZALEZ, F. M.; GONZALEZ, S. Q. U.; TORNIN, O.S.; ROSS, M. A. iópsia Pulmonar percutânea guiada por Tomografia Computadorizada: Dados de um hospital. **Radiol. Brás.**, v. 39, n.4, p.277-282, 2006.

CAYUELA, A.; RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, S.; LÓPEZ-CAMPOS, J.L.; VIGIL, E.; OTERO, R. Lung Cancer Mortality Trends in Spain Between 1980 and 2005. **Arch Bronconeumol.**, v. 44, n. 2, p. 70-74, 2008.

COLBY, T. V.; KOSS, M. N.; TRAVIS. Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Lower Respiratory Tract. Third series, fascicle 13, AFIP, 1994

COLBY, T.V.; YOUSEM, S. A. Chapter 18. Lungs. Histology for Pathologists. Edited by Stephen S. Sternberg. Lippincott. Ravan, Second edition, 1997.

Conduas do INCA/ MS – Guidelines, Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas, Non-Small Cell Lung Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 485-492, 2002.

Conduas do INCA/ MS – Guidelines, Carcinoma de Pulmão de Células Pequenas, Small Cell Lung Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.49, n. 3, p.149-152, 2003.

COHEN, R.; GUBER, A.; SIEGAL, A.; BRUDERMAN, I.; HUSZAR, M; YELLIN, A.; MAROM, Z.; GEIGER, B. The Prognostic Application of Cytokeratin Typing of Nonsmall Cell Lung Carcinoma A Retrospective Study. **CANCER**, v. 79, n. 3, 1997.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS T. eds. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 666-673, 2000.

COTRAN R. S.; ABBAS, A. K.; KUMAR, V. Fundamentos de Patologia. Bases Patológicas da doença, 7ª edição, 2006. Editora Elsevier.

CARVALHO, S.; BRANCO, R.; SERRALHEIRO, P.; SARAIVA, T.; CARVALHO, L. Adenocarcinoma do pulmão: Aplicação da classificação WHO 1999/2004 á

casuística do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital da Universidade de Coimbra. **Rev. Port. Patol.**, v. 12, n. 3, maio/jun, 2006.

CARVALHO, L. A nova classificação de tumores pulmonares- interesse meramente acadêmico? **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. x, n.1(supl 1), p. 9S-13S, 2004

CHU, P.G.; WEISS, L.M. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms:an immunohistochemical study of 509 cases. **Mod. Pathol.**, v. 15, n. 1, p. 6–10, 2002.

CHU, P.G.; WU, E. B. S.; WEISS, L.M. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: A Survey of 435 Cases. **Mod. Pathol.**, v. 13, n. 9, p. 962–972, 2000.

DACIC, S. Pulmonary Preneoplasia. **Arch Pathol Lab Med.**, v.132, p. 1073-1078, july, 2008.

DARBY, S.; WHITLEY, E.; DOLL, R.; KEY, T.; SILCOCKS, P. Diet, smoking and lung cancer: a case–control study of 1000 cases and 1500 controls in South-West England. **British Journal of Cancer**, v. 84, n.5, p. 728–735, 2001.

FERNANDEZ, A.; JATENE, F. B.; ZAMBONI, M. Diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. **J Pneumol.**, v. 28, n. 4, p. 219-228, 2002.

FLANDERS, W. D.; LALLY, C.A.; ZHU, B. P.; HENLEY, S.J.; THUN, M. J. Lung cancer mortality in relation to age, duration of smoking, and daily cigarette consumption: results from Cancer Prevention Study II. **Cancer Res.** V.63, n.19. p. 6556-62, oct, 2003.

FONG, K. M.; SEKIDO, Y.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. Lung Cancer. Molecular iology of lung cancer: clinical implications. **Thorax**, v. 58, p. 892-900, 2003.

FRANKLIN WILBUR A. Diagnosis of Lung Cancer: Pathology of invasive and pre invasive neoplasia. **CHEST**, v.117, p. 80-89S, 2000

FROST, J. K.; BALL, W. C.; LEVINML, T.; BAKER, R. R.; CARTER, D.; Early lung cancer detection: results of the inicial (prevalence) radiologic and cytologic screening in The Johns Hopkins Study. **Am Rev Respir Dis.**, v. 130, p. 549-554, 1984.

GASPARINI, S. “Bronchoscopic Biopsy Techniques in the Diagnosis and Staging of Lung Cancer.” **Monaldi Arch Chest Dis**, v.52, n. 4, p. 392-398, 1997.

GIGLIOTTI, A.; BONETTO, D.; ALVES, J. G.; JARDIM, J. R. B.; MARANHÃO, M. C.; ZAMBONI, M.; LARANJEIRA, R. Tabagismo. **Jornal Brasileiro de Medicina**, vol. 77, n. 2, 48-65, 1999.

GLASPOLE I. N.; WELLS, A.U.; du BOIS, R.M. Lung biopsy in diffuse parenchymal lung disease. **Monaldi Arch Chest Dis**, v.56, n. 3, p.225-232, 2001.

GLEDHIL, A.; BATES, C.; HENDERSON, D.; DACOSTA, P.; THOMAS, G. Sputum cytology: a limited role. **J Clin Pathol.**, v. 50, p. 566-568, 1997.

GUZMÁN-TORO, F.; TORRES, J.; GUERREIRO HERNÁNDEZ, Y.A.; TORRES, M.G.N. Tumores Neuroendocrinos: Apresentação de dos casos de Tumores Carcinoides del pulmón. **Rev. Venez. Oncol.**, v. 19, n. 3, p. 235-240, 2007.

GOLDSTEIN, N.S.; THOMAS, M. Mucinous and Nonmucinous Bronchioloalveolar Adenocarcinomas Have Distinct Staining Patterns With Thyroid Transcription Factor and Cytokeratin 20 Antibodies. **Am J Clin Pathol.**, v. 116, p. 319- 325, 2001.

GOMES, M. J. M. Ambiente e pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 5, p. 261-269, 2002.

GUIMARÃES, C. A. Mortalidade por câncer do pulmão. Lung cancer mortality. **J Bras Pneumol.**, v. 33, n. 5, p. 29-30, 2007.

GINSBERG et al. Cancer of the Lung. IN: Devita JR et al. eds Cancer: principles and practices of oncology. 5ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997. p. 658-677.

HAMMAR, S. P. Chapter 11. Lung and Pleural Neoplasms. Diagnostic Immunohistochemistry. Diagnostic Immunohistochemistry, edited by David J. Dabbs. Second edition, 2006.

HIRSCH, F.R.; HANSEN, H. H. The Clinical Relevance of Recent Developments in Pathology and Biology of Small Cell Lung Cancer. 5<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. **Chest**, v.91, n.1, july, 1989. Supplement.

HIRSCH, F.R.; MATTHEWS, M. J.; AISNER, S.; CAMPOBASSO, O.; ELEMA, J. D.; GAZDAR, A. F.; MACKAY, B.; NASIELL, M.; SHIMOSATO, Y.; STEELE, R. H.; YESNER, R.; ZETTERGREN, L. Histopathologic Classification of Small Cell Lung Cancer Changing Concepts and Terminology, **Cancer**, v. 62, p. 973-977, 1988.

HIRAYAMA T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. **BMJ (Clin. Res Ed)** 1981; 282:183-185

Histological typing of lung tumors, Vol. 1. 3<sup>rd</sup> ed. International Histological. World Health Organization. Histological typing of lung tumors. 3<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 1999; 1 (International Histological Classification of tumors, 1).

IRION, K.L.; IRION, L.D.; HOCHHEGGER, B. Core Biópsia, Tru-Cut biópsia, punção lancetante ou biópsia por punção com agulha fragmentante tecidual. **Radiol. Bras**, v. 39, n. 4, 2006.

IYODA, A.; HIROSHIMA, K.; NAKATANI, Y.; FUJISAWA, T. Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma: Its Place in the Spectrum of Pulmonary Carcinoma. **Ann Thorac Surg.**, v. 84, p. 702-707, 2007.

\_\_\_\_\_. Perspectivas de Câncer de Pulmão no Brasil. INCA, 2008 / Instituto Nacional de Câncer. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)

JAGIRDAR, J. Application of Immunohistochemistry to the Diagnosis of Primary and Metastatic Carcinoma to the Lung. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 132, March, 2008.

JAMNIK, S.; SANTORO, I. L.; BORGES, E. L. L. ; SILVA, W.V.; UEHARA, C. Características Clínicas, Diagnósticas e Laboratoriais de Portadores de Carcinoma Bronquioloalveolar, Clinical, Diagnostic, and Laboratory Characteristics of Patients with Bronchoalveolar Carcinoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n.1, p.11-16, 2008.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2008. **CA. Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n.2, p. 71-96, Mar-Apr, 2008.

JENSEN, S. M.; GAZDAR, A. F.; CUTTITTA, F.; RUSSELL, E. K.; LINNOILA, R. I. A Comparison of Synaptophysin, Chromogranin, and L- Dopa Decarboxylase as Markers for Neuroendocrine Differentiation in Lung Cancer Cell Lines. **Cancer Research**, v. 50, p. 6068-6074, September, 1990.

JIANG, F.; CARAWAY, N. P.; BEKELE, B. N.; ZHANG, H. Z.; WANG, H.; LI, R.; FERNANDEZ, R. R.; ZAIDI, T. M.; JOHNSTON, D. A.; KATZ, R. L. Surfactant Protein A Gene Deletion and Prognostics for Patients with Stage Inon Small Cell Lung Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 15, p. 5417-5424, 2005.

JUNKER, K.; WIETHEGE, TH.; MÜLLER, K. M. Pathology of small-cell lung cancer. **J. Cancer. Res. Clin. Oncol.**, v.126, p. 361-368, 2000.

KAZEROONI, E. A. Rastreo do cancro do pulmão. **Eur. Radiol.**, v. 15, Suppl 4, 2005.

KERR, K. M. Pulmonary preinvasive neoplasia. **J. Clin. Pathol.**, v. 54, p. 257-271, 2001.

KOMAKI, R.; MILAS, L.; RO, J. Y.; FUJII, T.; PERKINS, P.; ALLEN, P.; SIKES, C.R.; MOUNTAIN, C. F.; ORDONEZ, N.G. Prognostic Biomarker Study in Pathologically Staged N1 Non-Small Cell Lung Cancer. **I. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 40, n. 4, p. 787-796, 1998.

KOGA, T.; HASHIMOTO, S.; SUGIO, K.; YOSHINO, I.; MOJTAHEDZADEH, S.; MATSUO, Y.; YONEMITSU, Y.; SUGIMACHI, K.; SUEISHI, K. Clinicopathological and Molecular Evidence Indicating the Independence of Bronchioloalveolar. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p.1730-1738, June, 2001

LORENZONI, P.J.; DONATTI, M. I.; MULLER, P. T.; DOBASHI, P. N. Endoscopia respiratória em 89 pacientes com neoplasia pulmonary. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n. 2, p. 83-88, 2001.

LÓPEZ, F. C.; OSUNA, R. C.; LANAGRÁN, B. A.; GRACIA, R. O. Marcadores Y Antígenos Tumorales en el Carcinoma Broncopulmonar. **NEUMOSUR: Revista de la Asociación de Neumólogos del Sur**. v. 2, n. 2, diciembre, 1990.

LYDA, M. H.; WEISS, L. M. Immunoreactivity for Epithelial and Neuroendocrine Antibodies Are Useful in the Differential Diagnosis of Lung Carcinomas. **Human Pathology**, v. 31, n. 8, august, 2000.

LIU, Y.Y.; CHEN, Y.M.; HUANG, M.H.; PERNG, R. P. Prognosis and Recurrent Patterns in Bronchioloalveolar Carcinoma. **Chest**, v.118, p. 940-947, 2000.

MAIOLINO, P.; PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative Analysis. **Journal Comparative Pathology**, v.125, p.117-121, 2001.

MARSON, V. J.; MAZIERES, J.; GROUSSARD, O.; GARCIA, O.; BERJAUD, J.; DAHAN, M.;CARLES, P.; DASTE, G. Expression of TTF-1 and cytokeratins in primary and secondary epithelial lung tumours: correlation with histological type and grade **Histopathology**, v. 45, p.125-134, 2004.

MICHAEL, N. K; YAN-LING, M. A.; LAZZOLI, A. T. A.; PRYZGODZKI. Chapter 11. The lung and Mesothelium.

MILLS, B. cap 23. Imunohistoquímica, Métodos Histotecnológicos del AFIP.

MIRANDA, D. G. N.; JAMNIK, S.; SANTORO, I. L.; UEHARA, C. Avaliação do escarro induzido no diagnóstico do carcinoma brônquico Assessment of induced sputum in the diagnostic of broncogenic carcinoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p. 91-98, 2003.

MOREIRA, J. S; PORTO, N. S. e GEYER, G. R. Câncer de pulmão. In:TARANTINO. **Doenças Pulmonares**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 4ª edição, 651-666.

MOREIRA, J. S.; PORTO, N.; CAMARGO, J. J. e GEYER, G. R. Carcinoma brônquico. In: SILVA, L. C. C. **Condutas em Pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, v. 1, p. 553-568, 2001.

MORAN, C. A.; SUSTE, S.; COPPOLA, D.; WICK, M. R. Neuroendocrine Carcinomas of the Lung. A Critical Analysis. **Am J Clin Pathol.**, v. 131, p. 206-211, 2009

NAVARRO, F.M.; RAGASSON, C. A. P. ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE TABAGISMO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO, **CESUMAR** Jan./Jun., v. 09, n.1, p. 39-44, 2007.

NOVAES, F. T.; CATANEO, D. C.; RUIZ JUNIOR, R. L.; DEFAVERI, J. ; MICHELIN, O. C.; CATANEO, A. J. M. Câncer de pulmão:histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **J. Brás. Pneumol.**, v. 34, n. 8, p. 595-600, 2008.

NEPOMUCENO, J.C. Dieta e Câncer:vitaminas antioxidantes. Diet and antioxidantes vitamins. **Biosci. J, Uberlândia**, v. 21, n. 1, p.141-146, jan/april, 2005.

NEDA, K.; ZANDER, D. S.; LIU, J. TTF-1 and p63 for distinguishing pulmonary small-cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma in previously pap-stained cytologic material. **Modern Pathology**, v. 19, p. 1117-1123, 2006.

OLIVEIRA, T. B.; BUENO, T.; CURY, P. M. Câncer de Pulmão. **HB Científica**, v. 9, n. 1, jan-abr, 2002.

ORDÓÑEZ, N. G. Value of Cytokeratin 5/6 Immunostaining in Distinguishing Epithelial Mesothelioma of the Pleura From Lung Adenocarcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 10, p. 1215-1221, October, 1998.

ORDÓÑEZ, N. G. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study. **Modern Pathology**, v. 19, p.417-428, 2006.

OSWALD, N. C.; HINSON, K. F.; CANTI, G.; MILLER, A. B. The diagnosis of primary lung cancer with special reference to sputum cytology. **Thorax**, v. 26, p. 623-627, 1971.

PANKIEWICZ, W.; MINAROWSKI, Ł. NIKLIŃSKA, W.; NAUMNIK, NAUMNIK, W.; NIKLIŃSKI, J.; CHYCZEWSKI, L. Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 45, n.2, p. 65-74, 2007.

PARENTE, B.; QUEIROGA, H.; TEIXEIRA, E.; SOTTO-MAYOR, R.; BARATA, F.; SOUSA, A.; MELO, M. J.; JOÃO, F.; NEVEDA, R.; CUNHA, J.; et al. Estudo epidemiológico do cancro do pulmão em Portugal nos anos de 2000/2002. Epidemiological study of lung cancer in Portugal (2000/2002). **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 13, n. 2, Março/Abril, 2007.

PARKIN; BRAY, F.I.; DEVESSA S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. S5-S66, 2001

PARKIN, BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.55, p.74-108, 2005.

PARK, S. Y.; KIM, B. H.; KIM, J. H.; LEE, S.; KANG, G. H. Panels of Immunohistochemical Markers Help Determine Primary Sites of Metastatic Adenocarcinoma. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 131, p.1561-1567, 2007.

PELÚZIO, M. C. G.; VOLP, A. C. P.; QUEIROZ, I. C.; BRITO, C. J.; MIRANDA, T. C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas - Conhecendo seu papel. The suppressor proteins in malignant neoplasia - Knowing their role. Las proteínas supresoras en neoplasias malignas- Conociendo su función. **Rev Bras Nutr Clin.**, v. 21, n. 3, p. 233-238, 2006.

PINKERTON, L. E.; BLOOM, T. F.; HEIN, M. J.; WARD, E. M. Mortality among a cohort of uranium mill workers: anupdate. **Occup Environ Med.**, v. 61, n. 1, p. 57-64, 2004.

PORTA, R. R.; MEDINA, J. L. D.; HERNÁNDEZ, J. R. H.; ENCUESTRA, A. L.; ESCÚIN, J. S. C. Diagnóstico y estadificación del carcinoma broncogénico. Grupo de Trabajo de SEPAR, 1986.

PRAHL, P.H. Educacion medica continua. PRINCIPIOS BASICOS DA INMUNOHISTOQUIMICA. Publicación de la Sociedad de Dermatología Argentina, v. ix, n. 4, 2003.

RAMOS-VARA, J.; MILLER, M. A. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION<sup>+</sup>™ and ImmPRESS™. **Journal of Microscopy**, v. 224, p.135-139, 2006.

RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E. Antigen retrieval methods to optimize diagnostic immunohistochemistry: experience with 63 markers. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.12, p. 307-311, 2000.

RIVERA M. P.; DETTERBECK, F.; MEHTA, A. C. Diagnosis of Lung Cancer. The Guidelines, **Chest**, v. 123, p. 129-136, 2003.

ROSSI, R. G.; MARCHIONI, A.; MILANI, M.; SCOTTI, R.; FORONI, M.; CESINARO, A. M.; LONGO, L.; MIGALDI, M.; CAVAZZA, A. LARGE CELL CARCINOMA OF THE LUNG TTF-1, Cytokeratin 7, 34βE12, and CD56/NCAM Immunostaining in the Subclassification of Large Cell. **Am J Clin Pathol.**, v. 122, p. 884-893, 2004.

SANTOS-MARTÍNEZ, M. J.; CURULL, V.; BLANCO, M. L.; MACIÀ, F.; MOJAL, S.; VILA, J.; BROQUETAS, J. M. Lung Cancer at a University Hospital: Epidemiological and Histological Characteristics of a Recent and a Historical Series. **Arch Bronconeumol.**, v. 41, n.6, p. 307-312, 2005.

SASCO, A.J. Epidemiologic of Lung Carcinoma. **Rev. Prat.** , v. 53, p. 721-726, abr, 2003.

SHOPLAND, D.R. Tobacco Use and Its Contribution to Early Cancer Mortality with a Special Emphasis on Cigarette Smoking. **Environ Health Perspect.**, v.103 (Suppl 8), p. 131-134, 1995.

SHURE, D.; ASTARITA, R. "Bronchogenic carcinoma presenting as an endobronchial mass:optimal number of biopsy specimens for diagnosis". **Chest**, v.83, p. 865-867, 1983.

SICA G.; WAGNER, P. L.; ALTORKI, N.; PORT, J.; LEE, P. C.; VASQUEZ, M. F.; SAGI, A. Immunohistochemical Expression of Estrogen and Progesterone Receptos in Primary Pulmonary Neuroendocrine Tumors. **Arch. Pathol. Lab. Méd**, v. 132, p. 1889-1895, december, 2008.

SILVA JUNIOR, C. T.; CARDOSO, G. P.; ZAMBONI, M. Marcadores de diferenciação endócrina para diagnóstico do carcinoma de pequenas células extra-pulmonares. Markes of differentiation in extra-pulmonary small cell carcinoma, **Pulmão RJ**, v.13, n.1, jan-fev-mar, 2004.

SILVA JUNIOR, C. T.; CARDOSO, G. P.; SANTOS, L. M.; ZAMBONI, M.; BEHRIN, R. F. Diferenciação neuroendócrina do carcinoma brônquico não pequenas células. Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung cancer. **Pulmão RJ**, v. 13, n. 2, Abr-Mai-Jun, 2004.

SILVA JUNIOR, C. T.; CARDOSO, G. P.; SANTOS, L. M.; BEHRIN, R. F.; ZAMBONI, M.; ARAÚJO, E. G. Diferenciação neuroendócrina dos carcinomas brônquicos. Neuroendocrine differentiation in bronchogenic carcinomas. **Pulmão RJ**, v. 15, n.1, p. 39-43, 2006.

SOLER T. V.; ISAMITT, D.; CARRASCO, O. A. Rendimiento de la biopsia, cepillado y lavado bronquial por fibrobroncoscopia en el diagnóstico de cáncer pulmonar con lesiones visibles endoscópicamente. Yield of biopsy, brushing and bronchial washing through fiberbronchoscopy in the diagnosis of lung cancer with visible lesions. **Rev Méd Chile**, v. 132, p. 1198-1203, 2004.

SOTTO-MAYOR, R. Cancro do pulmão na mulher: Uma entidade diferente? Lung cancer in women: A different entity? **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. xii, n. 5, Setembro/Outubro, 2006.

SOTTO-MAYOR, R. Marcos históricos no estudo do cancro do pulmão. Historic landmarks in the study of lung cancer. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. xii, n. 4, julho/agosto, 2006.

SU, Y.C.; HSU, Y. C.; CHAI, Y. C. Role of TTF-1, CK20, and CK7 Immunohistochemistry for Diagnosis of Primary and Secondary Lung Adenocarcinoma. **Kaohsiung J Med Sci**. v. 22, n. 1, p.14–9, January, 2006.

TAYLOR, C. R.; COTE, R.J. Immunomicroscopy. A Diagnostic Tool for the Surgical. Major Problems in Pathology. Third edition, SAUNDERS, ELSEVIER, 2006

TRIGUEROS, G. E.; COMECHE, L.; ENCUESTRA, L.A.; ZULUETA, J. M.; GARRIDO, F. G.; COLINA, F. Bronchogenic Carcinoma 2000-2001: Characteristics and Overall Survival. **Arch Bronconeumol.**, v. 43, n. 11, p.594-598, 2007.

TOT, T. The Value of Cytokeratins 20 and 7 in Discriminating Metastatic Adenocarcinomas from Pleural Mesotheliomas, **Cancer**, v.92, p. 2737-2732, 2001.

TOT, T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. **Eur J Cancer**. V. 38, n.6, p.758-763, 2002.

THOMAS, JR. C. F.; TAZELAAR, D. H.; JETT, J. R. Typical and atypical Pulmonary Carcinoids: Outcome in Patients Presenting with regional Lymph node involvement. **Chest**, v. 119, p. 1143-1150, 2001.

THOMAS, M. M.; VIJAYARAJ, P.; LEUBE, R. E. Structural and regulatory functions of keratins. **Experimental Cell Research**, v. 313, p. 2021-2032, 2007.

TRAVIS W. D.; BRAMBILLA, E.; MÜLLER-HERMELINK, H. K.; HARRIS, C. C. Tumors of Lung, Pleura, Thymus and Heart. Pathology & Genetics. World Health Organization. Classification of Tumours. IARC. Press, Lyon, 2004.

TRAVIS W. D.; COLBY T. V.; CORRIN, B.; SHIMOSATO, Y.; BRAMBILLA, E. Histological Typing of Lung and Pleural Tumours. In coloboration with L.H. Sobin and Pathologists from 14 countries. Third edition, Heidelberg: Springer, 1999

TRAVIS WD, COLBY TV, CORRIN B, SHIMOSATO Y, BRAMBILLA E. Histological Typing of Lung and Pleural Tumours. **Respiratory**, v. 8, n. 4, p.513-521, 2003.

UEHARA, C.; JAMNIK, S.; SANTORO, I. L. Câncer de Pulmão, Lung Cancer. Simpósio: Doenças Pulmonares, **Medicina, Ribeirão Preto**, n. 31, p. 266-276, abr./jun,1998.

UEHARA, C.; SANTORO, I. L. e JAMNIK, S. Câncer de Pulmão: comparação entre os sexos. **Jornal de Pneumologia**, vol.26, nº6, 286-290, 2000.

VIEGAS, C. A. A. Formas não habituais de uso do tabaco. Non cigarette forms of tobacco use. **J. Bras. Pneumol.**, v. 34, n.12, p. 1069-1073, 2008.

WANG, G. F.; LAI, M.D.; YANG, R.R.; CHEN, P.H.; SU, Y.Y.; BING, J. LV.; SUN, L.P.; HUANG, Q.; CHEN, S. ZH. Histological Types and significance of bronchial epithelial dysplasia. **Modern Pathology**, v. 19, p. 429-437, 2006.

WHITROW, M.J.; SMITH, B.J.; PILOTTO, L. S.; PISANIELO, D.; NITSCHKE, M. Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature. **Respiratory**, v. 8, n. 4, p. 513-521, dec, 2003.

WUNSCH-FILHO, V.; BOFFETA, P.; COLIN, D. Familial cancer aggregation and the risk of lung cancer. **São Paulo Med. J.**, v.120, n. 2, p. 38-44, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. HISTOLOGICAL TYPING OF LUNG TUMORS. 3<sup>TH</sup> ED. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; 1 (INTERNATIONAL HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF TUMORS)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. CLASSIFICATION OF TUMOURS PATHOLOGY & GENETICS. TUMOURS OF THE LUNG, PLEURA, THYMUS AND HEART. Edited by William D. Travis, Elizabeth Brambilla, H. Konrad Müller-Hermelinck, Curtis C. Harris. IARC Press, LYON, 2004

YAMASHITA, S. Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v.41, p. 141-200, 2007.

YOUROSSIAN, A.B.; BRÜNDLER, M. A.; TOTSCH, M. Feasibility of the new WHO classification of pulmonary neuroendocrine tumours. **Swiss Med. Wkly**, v. 132, p. 535-540, 2002.

YESNER, R.; MATTHEWS, M.J. Pathology of Lung Cancer, World Health Organization Lung Cancer Classification

ZAMBONI, M. M. O novo estadiamento do câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 24, p. 1- 2, 1998.

ZAMBONI, M. M. Câncer do Pulmão. In: Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. *Pneumologia: Aspectos práticos e atuais*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 313-319.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer do pulmão. **J. Pneumol.**, v. 28, n. 1, jan/fev, 2002.

ZAMBONI MAURO; LANNES, D. C.; RORIZ, W.; CAVALCANTI, A.; TORQUATO, E. B.; CORDEIRO, Z. S. B; TOSCANO, E. Transthoracic biopsy with core cutting needle for the diagnosis of mediastinal tumors. **J. Pneumologia**, v. 29 n. 3, May/June, 2003.

ZAMBONI MAURO, LANNES, D.C.; MONTEIRO, A. S.; NASCIMENTO, M. S.; TOSCANO, E.; CAVALCANTI, A. M. S.; CORDEIRO, S. Z. B.; CORDEIRO, P.B. Punção aspirativa transbrônquica por agulha no diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. Transbrochial needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer. **J. Bras Pneumol.**, v. 31, n.2, p. 109-114, 2004.

ZAMBONI MAURO, MONTEIRO, A. S. Broncoscopia no Brasil. Bronchoscopy in Brazil. **J Bras Pneumol.**, v. 30, n. 5, p. 419-425, 2004.

ZHANG, H.; LIU, J.; CAGLE, P. T.; ALLEN, T.C.; LAGA, A.C.; ZANDER, D. Distinction of pulmonary small cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma: an immunohistochemical approach. **Modern Pathology**, v. 18, p. 111-118, 2005.

ZOU, S.M.; LIN, D. M.; LÜ, N.; LIU, X.Y.; WEN, P.; LIU, F. S. Use of thyroid transcription factor-1, surfactant protein-B, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in discrimination between primary and metastatic adenocarcinoma of lung. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. V. 83, n.15, p. 1350-1352, 2003.