

Requisitos mínimos para o laudo de anatomia patológica em câncer de pulmão: justificativas na patogênese*

VERA LUIZA CAPELOZZI¹, ALEXANDRE MUXFELDT AB'SABER², ALECSANDER GUILLAMON PEREIRA DA SILVA³,
CÉLIA PETROSSI GALLO³, FERNANDO BRANDÃO³

O pulmão é uma fonte de grande número de espécimens citológicos e histológicos. Destes espécimens o patologista deverá emitir um diagnóstico, tendo, dessa forma, importante papel no estabelecimento do estadiamento clínico e patológico. A prioridade do patologista na avaliação de um tumor pulmonar, para fazer um diagnóstico histológico específico, reside na avaliação do espécimen histológico; contudo, pode ser acompanhada de preparados citológicos. Aqui pode fazer-se necessária a suplementação por técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas. Se houver adequadas condições de fixação do tecido, técnicas especiais como microscopia eletrônica, imunoistoquímica em material congelado, citogenética e estudos moleculares poderão ser realizados. Exceção será feita se o material for muito pequeno, quando então deverá ser totalmente submetido à técnica de rotina; neste caso, se o diagnóstico não puder ser elaborado, biópsias subseqüentes poderão ser prospectivamente obtidas e direcionadas para a técnica especial de estudo. Este é o caso freqüentemente encontrado nos linfomas malignos, nos quais os espécimens de biópsia poderão ser muito pequenos e insuficientes para o diagnóstico definitivo sem imunofenotipagem. O estadiamento patológico de tumor primário de pulmão será alcançado quando houver adequado estudo macro e microscópico. Os procedimentos descritos a seguir poderão ser aplicados para ressecções por segmentectomia, lobectomia, pneumectomia, ressecções em bloco, traquéia ou brônquios. (*J Pneumol* 2002;28(4):201-218)

Minimum requirements for the anatomopathological report in lung cancer: justifications in the pathogenesis

The lung is source to a large number of cytological and histologic specimens. Pathologists should diagnose these specimens and then participate in the clinical and pathologic staging of the tumor. The first priority of pathologists when evaluating a lung tumor with specific histologic diagnosis can usually be accomplished with routine cytological or histologic preparations. These may be supplemented as necessary with ancillary histochemical or immunohistochemical studies. If adequate diagnostic tissue is available, special studies such as electron microscopy, frozen section immunostaining, cytogenetics, and molecular studies can be performed. In the case of small specimens, all tissue should be routinely processed; if a diagnosis cannot be rendered, subsequent biopsies can be prospectively triaged for the necessary and appropriate special studies. This is typical in cases of malignant lymphoma, in which biopsy specimens may be too small for definitive diagnosis without the aid of immunophenotype studies. The pathologic staging of a primary lung tumor is contingent on appropriate gross and microscopic examination of resection specimens. Standardized and unified staging schemes are necessary for comparative and collaborative studies of lung tumors. The following approach can be applied to segmentectomy, lobectomy, pneumectomy, en bloc resections, and tracheal or bronchial sleeve resections.

* Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. Apoio Científico: Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. LIM05- HCFMUSP – Laboratório de Investigação Médica – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

1. Professora Associada.

2. Pós-Graduando em Patologia Pulmonar.

3. Aluno de Graduação em Iniciação Científica – Fapesp.

Endereço para correspondência – Vera Luiza Capelozzi, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da USP, Av. Dr. Arnaldo, 455, 1º and., sala 1.143 – 01246-903 – São Paulo, SP. Tel. (11) 3066-7427; fax (11) 5096-0761. E-mail: vcapelozzi@lim05.fm.usp.br

Recebido para publicação em 5/9/01. Aprovado, após revisão, em 17/1/02.

Descritores – Neoplasias pulmonares. Avaliação. Diagnóstico. Marcadores biológicos de tumor. Estadiamento de neoplasias. Biópsia.

Key words – Pathologic report. Technical procedures. Biologic tumor markers. Lung cancer. Pathologic staging. Lung neoplasms. Evolution. Diagnosis. Neoplasm stages. Biopsy.

INTRODUÇÃO

Magnitude do problema – O câncer de pulmão é a segunda neoplasia mais freqüente nos Estados Unidos e representa a principal causa de morte por câncer naquele país⁽¹⁾. Estimava-se que nos Estados Unidos seriam diagnosticados 171.500 casos novos e ocorreriam 160.000 mortes por câncer de pulmão no ano de 2000. Nesse mesmo país o câncer de pulmão é responsável por 14% de todos os casos novos de câncer no homem, mais freqüente depois do câncer de próstata, que representa 36%. Entre as mulheres também ocupa a segunda posição em incidência, 13% de todos os casos novos, precedido pelo câncer de mama, que é responsável por 32%. O carcinoma de pulmão é a principal causa de morte tanto no homem (33% de todas as mortes por câncer) quanto na mulher (24% de todas as mortes por câncer).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde⁽²⁾, estimou-se a ocorrência de 20.000 casos novos de câncer de pulmão no ano de 1998, sendo o quarto sítio mais freqüente, precedido pelo câncer de mama, colo uterino e estômago. Nos homens é o câncer mais freqüente (15.040 casos novos), sendo também o mais letal, com 9.400 mortes estimadas para o ano de 1998. Entre as mulheres o câncer de pulmão representa o quinto sítio mais comum, com 4.960 casos novos e 3.300 mortes estimadas para o ano de 1998.

O carcinoma broncogênico vem representando um grande desafio para os oncologistas, uma vez que, apesar de todos os avanços diagnósticos e terapêuticos, a taxa de sobrevivência global em cinco anos permanece inalterada em 13% ao longo das últimas décadas⁽³⁾.

Clinicamente, os carcinomas broncogênicos são classificados em carcinoma de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) e carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP). O CPCNP é o mais freqüente, 75 a 80% de todos os casos⁽³⁾, e nestes pacientes o estadiamento clínico é fundamental para estabelecer a estratégia terapêutica.

Em geral, o tratamento locorregional (cirurgia ou radioterapia) é recomendado para os pacientes com doença localizada. Os pacientes com CPCNP metastático são submetidos a tratamento quimioterápico. A base do tratamento dos pacientes com CPCP é a quimioterapia⁽⁴⁾.

Síglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho

AgNORs – *Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions*
NORs – Regiões organizadoras nucleolares
CCNP – Carcinomas de células não-pequenas
CEA – Antígeno carcino-embriônico
Chr A – Cromogranina A
CK20 – Ceratina de alto peso molecular
CK7 – Ceratina de baixo peso molecular
CPC – Carcinomas de pequenas células
CPCNP – Carcinomas de pulmão de células não-pequenas
CPCP – Carcinoma de pulmão de células pequenas
CPK-BB – Creatina fosfoquinase-BB
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EGFR – Receptor para fator de crescimento epidérmico
EMA – Antígeno epitelial de membrana
FISH – *In situ hybridization*
SKY – Cariótipo espectral
FTI – Inibidor de farnesiltransferase
GRP – Peptídeo liberador de gastrina
GTP – Guanosina trifosfato
HMF6-2 – Glóbulos de gordura do leite humano
HPV – *Human papillomavirus*
LCC – Carcinoma de grande células
NCAM – Molécula de adesão celular neural
NSCC – Carcinomas não-pequenas células
PCNA – Antígeno de proliferação nuclear
PDLC – Carcinoma pouco diferenciado de pulmão
PH – Perda de heterozigose
pRB – *Probe*
RNA – Ácido ribonucleico
RNAr – Ácido ribonucleico ribossômico
SCC – Carcinomas de pequenas células
SCC-Ag – Antígeno do carcinoma de células escamosas
sIL-2R – Receptor de interleucina solúvel -2
SqCC – Carcinoma de células escamosas
TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinases
TNM – Estadiamento TNM
TPA – Antígeno polipeptídeo tecidual

A maioria dos pacientes com CPCNP apresenta doença em estádios avançados na ocasião do diagnóstico, sendo este um dos motivos da sua alta taxa de mortalidade. Estima-se que, no momento do diagnóstico de CPCNP, 20% dos pacientes têm doença localizada, 25% têm extensão da neoplasia para os linfonodos mediastinais e 55% já apresentam metástases a distância⁽⁵⁾.

Nos estádios mais precoces a ressecção cirúrgica representa a chance real de cura⁽⁶⁾; entretanto, mesmo no estágio clínico IA (T1N0M0), cerca de 30 a 40% dos pacientes morrerão em consequência da progressão da neo-

plasia⁽⁶⁻⁸⁾, principalmente à custa de recidiva sistêmica. A administração de terapêutica adjuvante para esses pacientes ainda não mostrou claro benefício na melhora da sobrevivência⁽⁹⁾. Por esse motivo, a identificação de fatores prognósticos vem sendo objeto de estudo de diferentes pesquisadores, com a finalidade de selecionar os pacientes com maior risco de recidiva. Esses pacientes selecionados teriam benefício potencial com terapêuticas adjuvantes, que visam evitar a recidiva da neoplasia e a sua evolução fatal.

Várias características clínicas, patológicas e moleculares vêm sendo estudadas e apontadas como fatores determinantes da sobrevivência nos pacientes com CPCNP^(6,10). Os fatores mais importantes para avaliação prognóstica são o *performance status*, o estadiamento clínico e a perda de peso^(3,6). Estas características são utilizadas como parâmetros para avaliar o impacto na sobrevivência dos novos fatores prognósticos pesquisados.

Avanços recentes na definição histopatológica do câncer de pulmão – O conhecimento de imunistoquímica, morfometria, biologia molecular e cinética celular tem sido usado para estimar o grau de proliferação de tumores malignos⁽¹¹⁾, dessa forma contribuindo para determinar fatores preditivos de sobrevivência entre os pacientes com neoplasias. Índice de mitoses, DNA ploidia e conteúdo de regiões organizadoras nucleolares (NORs) têm sido valorizados atualmente como medidas do grau de atividade proliferativa das células cancerosas. De posse dessas informações, seria possível, então, definir, por exemplo, os carcinomas de células escamosas (SqCC), estágio I, mais agressivos, instituindo-se precocemente terapia coadjuvante visando impedir a disseminação sistêmica e talvez alcançar a cura dos pacientes. O termo “carcinoma pouco diferenciado de pulmão” (PDLC) refere-se a uma neoplasia maligna pulmonar com ausência de características morfológicas distintas à microscopia de luz. Embora um diagnóstico de PDLC não interfira na conduta do paciente, cujo estadiamento favoreça, de antemão, a ressecção cirúrgica ou apenas o tratamento paliativo, freqüentemente o uso desse termo obscurece o reconhecimento do verdadeiro SqCC e atrasa o estabelecimento da terapia efetiva. Não obstante, para atender aos objetivos deste capítulo, o termo PDLC será utilizado tanto para mostrar as dificuldades diagnósticas, quanto para apresentar os avanços diagnósticos na valorização desses tumores.

O papel da classificação – Quando a primeira ressecção curativa do câncer de pulmão foi relatada em 1933, pouco era conhecido sobre as importantes implicações terapêuticas impostas pelos vários tipos histológicos de neoplasias pulmonares^(12,13). À medida que mais e mais tumores pulmonares foram ressecados, tornou-se claro que pacientes com carcinomas de pequenas células (SCC)

não eram sérios candidatos à cirurgia, uma vez que eles disseminavam-se sistemicamente com grande rapidez. Com a introdução de quimioterapia combinada para SCC, em 1970, tornou-se claro que muitos pacientes com câncer de pulmão poderiam curar-se ou obter importantes remissões clínicas, desde que modalidades terapêuticas fossem adequadamente aplicadas. Conseqüentemente, tornou-se incrivelmente importante desenvolver uma classificação para o câncer de pulmão que permitisse reconhecer adequadamente os diferentes tipos de tumor. Do ponto de vista clínico, a distinção mais importante deve ser feita entre os SCC e os carcinomas não-pequenas células (*non-SCC*). Existem diversas classificações histológicas para o câncer de pulmão. A mais usada pelo grupo de patologia pulmonar da FMUSP é a classificação da Organização Mundial de Saúde⁽¹⁴⁾, recentemente publicada, que reconhece sete tipos maiores de câncer de pulmão:

- 1) Carcinoma de células escamosas (SqCC)
 - a. Papilífero
 - b. Células claras
 - c. Pequenas células
 - d. Basalóide
- 2) Carcinoma de pequenas células (SCC)
 - a. Carcinoma de pequenas células combinado
- 3) Adenocarcinoma
 - a. Acinar
 - b. Papilífero
 - c. Carcinoma bronquioalveolar
 - d. Não-mucinoso
 - e. Mucinoso
 - f. Misto mucinoso e não-mucinoso
 - g. Sólido com produção de mucina
 - h. Adenocarcinoma com subtipos mistos
 - h1. Adenocarcinoma fetal bem diferenciado
 - h2. Adenocarcinoma (“colóide”) mucinoso
 - h3. Cistadenocarcinoma mucinoso
 - h4. Adenocarcinoma em células “anel de sinete”
 - h5. Adenocarcinoma de células claras
- 4) Carcinoma de grandes células (LCC)
 - a. Carcinoma de grandes células neuroendócrino
 - b. Carcinoma de grandes células neuroendócrino combinado
 - c. Carcinoma basalóide
 - d. Carcinoma de células claras
 - e. Carcinoma de grandes células com características rabdóides
- 5) Carcinoma adenoescamoso
- 6) Carcinoma com elementos pleomórficos e sarcomatóides
 - a. Carcinomas com células gigantes ou fusiformes
 - a1. Carcinoma pleomórfico
 - a2. Carcinoma de células fusiformes
 - a3. Carcinoma de células gigantes

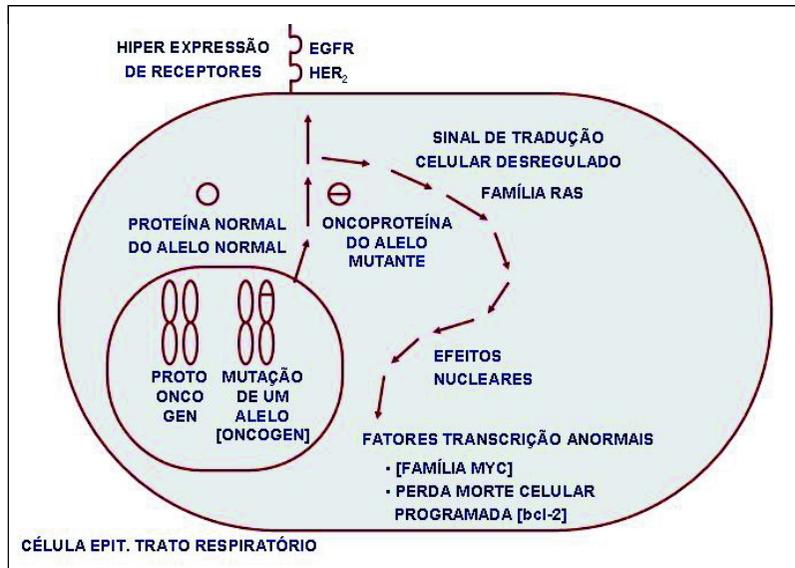


Figura 1 – Oncogenes dominantes

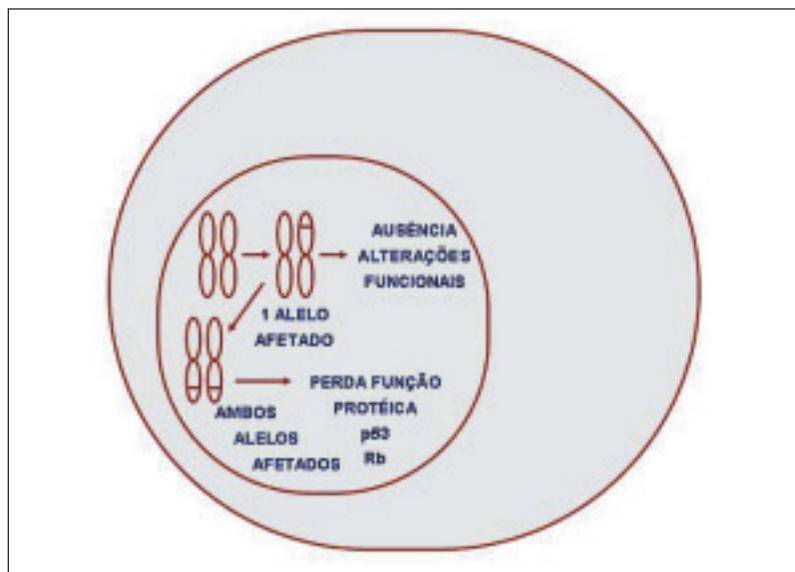


Figura 2 – Oncogenes recessivos

- b. Carcinossarcoma
- c. Blastoma pulmonar
- 7) Tumor carcinóide
 - a. Carcinóide típico
 - b. Carcinóide atípico

A intenção de tais sistemas classificatórios é fornecer critérios à microscopia de luz que possam permitir estabelecer diagnósticos consistentes entre os patologistas. Com tal disciplina, comparativamente, os protocolos de tratamento podem então ser estabelecidos. Quando os critérios propostos por esses sistemas classificatórios são

obedecidos, há 90% de concordância entre os diagnósticos emitidos por patologistas experientes. Diversos estudos têm mostrado a aplicabilidade e reprodutibilidade dessa classificação ao considerar que há estreita correlação quanto ao tipo de tumor presente no espécimen de biópsia, ressecção cirúrgica e metástase linfonodal⁽¹⁵⁾. Grande variabilidade interobservador é encontrada na identificação do carcinoma indiferenciado de grandes células frente ao carcinoma de células escamosas pouco diferenciado e adenocarcinomas pouco diferenciados. Grande especificidade nesse reconhecimento pode ser obtida quando

microscopia eletrônica é feita em cada tumor, apesar das dificuldades práticas da técnica na rotina diagnóstica, bem como seus custos. Parte das dificuldades em situar com exatidão carcinomas de pulmão em uma das sete categorias previamente estabelecidas decorre do fato de que muitos de tais tumores exibem combinações de padrões morfológicos⁽¹⁶⁾. Em um estudo de 100 casos consecutivos de câncer de pulmão no qual o tumor inteiro ou 10 blocos foram examinados, apenas 34% foram compostos de um único tipo⁽¹⁷⁾. Esperanças recentes de que a imunoistoquímica previsse uma separação nítida entre os diversos tipos histológicos não têm sido alcançadas; ao contrário, têm fornecido evidências para considerável *overlap* dos perfis antigênicos entre os diferentes tipos histológicos⁽¹⁸⁾. Na prática, deve ser enfatizado também que o método utilizado para classificar os tumores influenciará enormemente os resultados. Assim, por exemplo, carcinomas adenoescamosos aumentarão proporcionalmente as séries de casos estudados por microscopia eletrônica em relação àqueles analisados apenas à microscopia de luz.

Os sistemas classificatórios apresentados utilizam critérios diagnósticos à microscopia de luz, não incluindo, portanto, o termo "PDLC", cujos defensores preconizam a utilização da microscopia eletrônica na sua caracterização.

Problemas diagnósticos – Problemas que impedem o diagnóstico de câncer de pulmão podem ser de natureza técnica ou interpretativa. Problemas técnicos incluem *crushing* dos espécimens de biópsia, fixação inadequada, cortes espessos, artefatos por dessecação e impregnação acentuada dos corantes nos tecidos (Figura 1). Cada um desses fatores poderá distorcer os detalhes nucleares e citoplasmáticos, impedindo um diagnóstico preciso. Inadequada representação do tumor pode fornecer ao patologista substrato indubitavelmente maligno, porém insuficiente para classificá-lo (Figura 2). Nessas situações, esforços deverão ser feitos no sentido de ao menos separar tumores indiferenciados de grandes e pequenas células, ainda que, em algumas situações, tal ampla separação possa ser impossível por falta de material avaliável. Se o SCC for excluído com certeza, o uso do termo carcinoma anaplásico de grandes células poderá assegurar ao clínico que um tumor de pequenas células não foi *over* diagnosticado.

Em anos recentes, eletronmicroscopistas e citopatologistas têm questionado se realmente existe um carcinoma de "grandes células" puro. Eletronmicroscopistas frequentemente identificam características ultra-estruturais de um tumor anaplásico fornecedoras de diferenciação escamosa, glandular, ou mesmo de pequenas células⁽¹⁹⁾. Citopatologistas freqüente e corretamente interpretam um tumor como escamoso, glandular, ou mesmo pequenas células, quando o material disponível pelo patologista é ina-

dequado ou carece de marcadores histológicos para um diagnóstico preciso. Patologistas são particularmente relutantes em usar o termo carcinoma anaplásico de grandes células e recorrem ao termo PDLC para o diagnóstico histopatológico.

Problemas interpretativos na classificação do câncer de pulmão incluem os seguintes:

- 1) aspirados por agulha;
- 2) tumores com expressão de múltiplos fenótipos;
- 3) SCC que formam túbulos, escamas ou células gigantes sinciciais podem ser erroneamente interpretados como não-pequenas células;

4) dificuldades no reconhecimento da variante mista de grandes e pequenas células do SCC. Biologicamente, este tumor é semelhante à variante clássica (*oat-cell*) do SCC, ocorrendo com freqüência comparável. Compõe-se de células com núcleos maiores e mais proeminentes citoplasmas que a variante clássica. Se as características nucleares são hipervalorizadas (cromatina dispersa e nucléolos indistintos), os tumores são erroneamente interpretados como "PDLC".

Medidas para utilização do termo "PDLC" – Em vista das opções terapêuticas vigentes, todo esforço deverá ser feito na tentativa de separar, ao menos à microscopia de luz, tumores pulmonares em pequenas células e não-pequenas células. Microscopia eletrônica, dados clínicos e laboratoriais podem fornecer critérios importantes para melhor definição de casos rotulados como "PDLC". Tumores caracterizados como "PDLC" devem incluir cortes para uma segunda opinião, citologia e processamento para microscopia eletrônica. Desde que a microscopia eletrônica é uma técnica nem sempre acessível na rotina diagnóstica, critérios histológicos deverão ser explorados ao máximo. Neste contexto, colorações especiais por histoquímica (mucina) e imunoistoquímica (queratina, CEA, cromogranina) deverão ser consideradas.

PROCEDIMENTOS DE ROTINA PARA ESPÉCIMENS PULMONARES

Espécimens pulmonares (Quadro 1) podem ser examinados a fresco ou após fixação em formalina; cada um com vantagens e desvantagens. Insuflação com formalina e fixação poderá ser obtida por canulação do brônquio (ou artéria pulmonar) e insuflação com formalina a 10% tamponada sob pressão de 20cm de água, ou em um reservatório que cubra os espécimens por completo. O parênquima pulmonar normal é adequadamente fixo em poucas horas por cortes macroscópicos, mas geralmente fixação *overnight* é necessária para grandes tumores ou pulmões extensamente consolidados. Espécimens insuflados serão seccionados em fatias com inter-

QUADRO 1 Espécimens contendo tumores pulmonares
<p>Espécimens citológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Escarro • Aspirado transtraqueal • Escovado brônquico • Lavado brônquico • Lavado broncoalveolar (LBA) • Citologia sangue artéria pulmonar • Aspirados transtraqueal e tranbrônquico por agulha • Aspirados por agulha fina, esfregaços, e <i>imprints</i> obtidos a partir de espécimens histológicos • Derrames (especialmente pleura)
<p>Espécimens histológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Biópsias <ul style="list-style-type: none"> Brônquica/traqueal Transbrônquica Biópsia por toracosopia Punção/biópsia transtorácica Biópsia por mediastinoscopia (metástases linfonodos) Toracotomia com biópsia • Espécimens por ressecção* <ul style="list-style-type: none"> Biópsia a céu aberto Ressecção em cunha Segmentectomia Lobectomia Bilobectomia Pneumectomia Ressecção radical em bloco incluindo estruturas adjacentes Ressecção de grandes vias aéreas • Espécimens de autópsia
<p>* Qualquer dos espécimens poderá incluir porções de estruturas adjacentes, como pleura parietal, parede torácica, estruturas mediastinais, etc.</p>

QUADRO 2 Partilha do tecido pulmonar para estudos especiais
<p>Tecido fresco</p> <ul style="list-style-type: none"> • Citometria de fluxo • Citogenética • Cultura de células
<p>Congelamento a 80° de tecido tumoral e não-tumoral</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cortes congelados para imunoistoquímica, incluindo marcadores linfóides • Genética molecular/rearranjo gênico • Bioquímica quantitativa (e.g.: peptídeos hormonais)
<p>Glutaraldeído para microscopia eletrônica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cubos ou lâminas de tecidos de 1mm
<p>Tecido não-tumoral para análise quantitativa de fibras (e.g.: asbesto)</p>

valos regulares no plano sagital, embora para correlação com tomografia computadorizada sejam mais adequados os cortes transversais no plano horizontal. Os cortes obtidos deverão ser mantidos em ordem, a fim de não serem perdidas relações anatômicas. Pulmões frescos não-insuflados são abertos ao longo das vias aéreas, com particular atenção para a presença de tumores localizados e suas relações com vasos. Antes disso, a margem brônquica já terá sido examinada por cortes congelados.

O laudo anatomopatológico – Independente da avaliação macroscópica, as informações a seguir deverão ser registradas no laudo anatomopatológico para fins de diagnóstico e estadiamento:

1) Exame externo do espécimen, incluindo dimensões, peso, cor, aspecto da pleura e outras estruturas incluídas (pericárdio, parede torácica, etc.).

2) Subtipo histológico e grau⁽²⁰⁾; localização (por segmento, quando possível); cor, consistência; alterações se-

cundárias (cavitação, p.e.); tamanho das três dimensões; tumorações endobrônquicas ou intravasculares; relações com mucosa brônquica, parede brônquica, pleura, fissuras e margens cirúrgicas (delineação com tinta nanquim e colorações para elástica são úteis para obter tais informações); distância da margem brônquica e pleural; alterações secundárias (especialmente pneumonia obstrutiva); invasão vascular; invasão de estruturas adjacentes (pleura, parede torácica) e margens; associação com displasia/carcinoma *in situ* na mucosa brônquica proximal. A pleura deverá incluir lâminas elástica interna e externa e respectivas invasões (melhor constatadas em colorações para fibras elásticas).

3) Tecido não tumoral deverá ser investigado para condições associadas, tais como bronquite crônica, enfise- ma, asbestose e bronquiolite respiratória (tabagismo). Tecidos exibindo efeitos secundários, tais como pneumonia obstrutiva, deverão ser evitados durante tal avaliação.

4) Exame dos linfonodos deverá incluir aqueles dissecados no espécimen principal, tanto quanto aqueles removidos pelo cirurgião. Os linfonodos deverão ser designados de acordo com sua localização anatômica para os propósitos de estadiamento. Para aqueles obtidos no espécimen principal, suas relações com o tumor deverão ser anotadas.

5) Os tecidos enviados em separado (pericárdio, p.e.) deverão ser examinados e descritos separadamente.

6) Selecionar tecido tumoral e não-tumoral para estudos especiais (Quadro 2).

7) Documentação fotográfica das características anteriormente apontadas e designação dos locais para representação histológica; desenho ou xerox do espécimen

original poderão ser úteis para correlação com os cortes designados.

Um mínimo de três cortes do tumor e um do tecido não-tumoral deverão ser examinados de rotina. Tais cortes deverão conter relações do tumor com a mucosa e parede brônquica, bem como a pleura. Um corte histológico da margem brônquica deverá ser incluído. Todos os linfonodos, designados, e margens deverão ser submetidos a exame histológico. Em caso de lesões clinicamente ocultas, principalmente carcinomas de células escamosas *in situ* ou microinvasivo, e casos de displasia, deverão ser estudados em cortes seriados da árvore brônquica. O exame e a descrição dos espécimens tumorais deverão ser direcionados a fornecer informações para o estadiamento TNM. Informações mínimas necessárias no laudo anatomopatológico estão contidas no Quadro 3.

Protocolos para câncer de pulmão deverão ser utilizados na prática pelos grupos de tórax. Um exemplo correntemente usado é o preconizado pelo grupo do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, que foi publicado por Rosai⁽²¹⁾.

TÉCNICAS ESPECIAIS – MARCADORES BIOLÓGICOS

Grandes avanços têm tomado lugar no diagnóstico e estudo dos tumores pulmonares devido a uma explosão no desenvolvimento das técnicas especiais nos campos da imunohistoquímica, citometria de fluxo, hibridização *in*

situ e biologia molecular. Esses desenvolvimentos têm revolucionado a acurácia diagnóstica de certos tipos de tumores pulmonares e o melhor entendimento da histogênese e patogênese. Características clínicas, patológicas e moleculares vêm sendo estudadas e apontadas como fatores determinantes da sobrevida nos pacientes com CPCNP^(6,10). Os fatores mais importantes para avaliação prognóstica são o *performance status*, o estadiamento clínico e a perda de peso^(3,6). Estas características são utilizadas como parâmetros para avaliar o impacto na sobrevida dos novos fatores prognósticos pesquisados. Dentre estes, a concentração sérica dos marcadores tumorais vem sendo estudada nos pacientes com CPCNP⁽²²⁾.

Marcador biológico define alterações celulares e moleculares associadas à transformação maligna. Podem ser de dois tipos: 1) marcadores intermediários que medem alterações celulares e moleculares antes do aparecimento da malignidade; 2) marcadores diagnósticos: presentes em associação com a malignidade⁽²³⁾. O processo de identificação e validação para uso clínico do marcador tem diversas etapas:

- Identificação inicial feita em linhagens celulares do tumor em questão;
- Teste do marcador em tecido proveniente de biópsias de pacientes com diagnóstico estabelecido do tumor em questão;
- Teste em biópsias de tecidos normais e com processo inflamatório;
- Teste em escarro, sangue ou urina para validação como teste não-invasivo que possa ser usado em população de alto risco.

Marcadores biológicos diagnósticos

Marcadores biológicos diagnósticos são substâncias que podem ser medidas quantitativamente por métodos bioquímicos, imunológicos e moleculares nos fluidos ou nos tecidos corporais, associados a neoplasias e possivelmente com o órgão de origem^(23,24). Nas últimas décadas, várias proteínas e pequenos peptídeos têm sido identificados como produtos de secreção de diferentes neoplasias sólidas⁽²⁵⁾, podendo ser utilizados como marcadores tumorais diagnósticos.

Em 1848, Bence Jones descreveu a proteína do mieloma múltiplo, primeira substância empregada clinicamente como marcador tumoral⁽²⁵⁾. Desde então, várias outras substâncias vêm sendo pesquisadas em neoplasias de diferentes sítios primários, com o objetivo de avaliar a sua aplicação na prática clínica.

Os marcadores biológicos diagnósticos podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognósti-

QUADRO 3 Informações anatomopatológicas mínimas de espécimens ressecados necessárias para estabelecimento do TNM
<p>Características do tumor (T):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tipo histológico e grau* • Tamanho (maiores dimensões) • Distância e condições da margem brônquica • Invasão da pleura (visceral ou parietal; fissuras) e estruturas adjacentes (e margens) • Pneumonia obstrutiva associada
<p>Linfonodos (N):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Número total de linfonodos envolvidos, designados pelo cirurgião e dissecados na peça
<p>* Grau histológico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bem diferenciado • Moderadamente diferenciado • Pouco diferenciado • Indiferenciado
<p><small>* American Joint Committee on Cancer Lung. In: Bearhs OH, Henson DE, Hutter RV, Kennedy BJ, editors. Manual for staging of cancer, Vol. 4. Philadelphia: JB Lippincott, 1992;115-22.</small></p>

co. Inúmeras substâncias estão sendo continuamente descobertas e algumas amplamente empregadas na prática diária, apesar de poucas evidências científicas que autorizem a sua aplicação clínica⁽²⁶⁾.

Em pacientes com câncer de pulmão os marcadores biológicos diagnósticos propriamente ditos não se mostraram úteis como recurso diagnóstico, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade. Entretanto, os marcadores biológicos diagnósticos podem ser utilizados para expressar diferentes características biológicas dos carcinomas broncogênicos⁽²⁷⁾.

Marcadores biológicos diagnósticos sorológicos – Várias substâncias classificadas como marcadores biológicos diagnósticos séricos já foram estudadas em pacientes com CPCNP. Os marcadores biológicos diagnósticos séricos mais estudados em pacientes com CPCNP são: CEA, TPA [antígeno polipeptídico tecidual], SCC-Ag [antígeno do carcinoma de células escamosas], Chr A [cromogranina A], NSE, CYFRA21.1, NCAM [molécula de adesão celular neural]; CPK-BB [creatina fosfoquinase-BB]; sIL-2R [receptor de interleucina solúvel-2]. As principais aplicações clínicas pesquisadas para estes marcadores são o seu papel no estadiamento e na avaliação prognóstica.

Poucos pesquisadores brasileiros estudaram o papel dos marcadores biológicos séricos em pacientes com carcinoma broncogênico. Em 1992, Takagaki⁽²⁷⁾ analisou o papel dos marcadores biológicos diagnósticos em 60 pacientes com carcinoma broncogênico. Observou que o CEA foi o marcador mais freqüentemente aumentado nestes pacientes e o CA72.4 o que melhor se correlacionou com a extensão da neoplasia. Em 1999, Gross⁽²⁸⁾ estudou 103 pacientes com CPCNP e observou que o CYFRA21.1 foi o marcador mais elevado [55%], seguido pelo CA72.4 [50%], CEA [44,4%], enolase neurônio-específica [35,7%], CA15.3 [31%] e CA19.9 [14,7%]. Nesse estudo, isoladamente nenhum dos marcadores biológicos diagnósticos teve valor prognóstico independente, porém a associação de marcadores biológicos elevados pode auxiliar na identificação dos pacientes com pior sobrevida.

Marcadores biológicos diagnósticos histológicos

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Características submicroscópicas têm sido identificadas para distinguir tumores pulmonares^(29,30). Dos 41 carcinomas de pulmão considerados como carcinomas anaplásicos de grandes células à microscopia de luz, Delmonte⁽²⁹⁾ e Capelozzi *et al.*⁽³⁰⁾ encontraram oito (40%) com ausência de evidências ultra-estruturais de diferenciação. Os 33 remanescentes mostraram alguma evidência de diferenciação escamosa (desmossomos e tonofilamentos), glandular (microvilos ou microácinos) ou neuroendócrina. SCC,

independente do subtipo, apresentam núcleo redondo ou oval com cromatina finamente dispersa, citoplasma escasso e organelas esparsas. Desmossomos podem ser identificados. Dentro dos processos citoplasmáticos, pequenos grânulos neurosecretórios podem ser identificados. Estes tumores diferem dos carcinóides pela presença nestes de maior número de grânulos neurosecretórios⁽³¹⁻³³⁾.

MORFOMETRIA

A morfometria tem-se mostrado como ferramenta útil na determinação de fatores morfológicos de prognóstico em câncer de pulmão, em parte por minimizar a subjetividade dos sistemas classificatórios, em parte por permitir a construção de modelos matemáticos preditivos de sobrevida⁽³⁰⁻³⁵⁾. Assim, no carcinoma de células escamosas, o subtipo histológico mais freqüente de câncer de pulmão, que tem na ressecção cirúrgica o método ideal de tratamento, é sabido que, apesar do estadiamento ainda ser importante na determinação da sobrevida, pacientes com doença localizada apresentam recidivas nos primeiros cinco anos após ressecção cirúrgica. Para identificar quais seriam esses pacientes, foram estudados marcadores morfológicos de espécimens cirúrgicos relevantes para compor um modelo matemático em prever sobrevida. Assim, da análise histológica do espécimen, células tumorais exibindo relação núcleo/citoplasmática ou volume nuclear altos apresentaram melhor sobrevida. Estes resultados sugerem que a constatação inversa dos mesmos parâmetros poderia selecionar os pacientes candidatos a modalidades terapêuticas complementares para evitar a recidiva tumoral⁽³³⁾. Esta sugestão foi reforçada pelos resultados obtidos nos carcinomas de células escamosas avançados pelo mesmo método. Neste estudo, constatamos que tumores apresentando células com relação núcleo/citoplasma e volumes nucleares baixos tiveram melhor comportamento em termos de sobrevida dos pacientes, possivelmente por melhor efeito radioterápico sobre as células assim caracterizadas⁽³⁴⁾. Dando prosseguimento ao estudo, outro trabalho foi concebido para avaliar o papel de parâmetros clínicos e morfométricos em discriminar resposta à quimioterapia em pacientes com carcinomas de pequenas células do pulmão. Os resultados obtidos mostraram que o volume dos núcleos e a angiogênese tumoral foram as variáveis morfométricas mais relevantes para separar os dois grupos de pacientes, conferindo sensibilidade de 80,43% ao modelo. Concluiu-se, através dos resultados obtidos, que parâmetros histopatológicos podem fornecer informações valiosas quanto ao grau de resposta dos tumores à quimioterapia em pacientes com carcinomas de pequenas células do pulmão, encorajando o uso de procedimentos morfométricos na análise destes tumores⁽³⁵⁾.

IMUNOISTOQUÍMICA

A imunistoquímica dos tumores pulmonares consiste em uma poderosa ferramenta diagnóstica usada para detectar marcadores epiteliais, mesenquimais, linfóides, melanocíticos, neuroendócrinos hormonais e moleculares. A seguir, uma breve discussão sobre alguns marcadores para câncer de pulmão.

Carcinomas de células escamosas demonstram reatividade para queratinas de baixo e alto peso molecular e para involucrina. Imunorreatividade também tem sido constatada para vimentina, antígeno epitelial de membrana (EMA), glóbulos de gordura do leite humano (HMF6-2), proteína S-100, Leu-M1 e CEA. Mutações do antígeno p53 são comuns e costumam ser detectadas no estágio precoce da doença. A mucosa adjacente ao tumor usualmente mostra metaplasia escamosa e carcinoma *in situ*. Recentemente, presença de HPV foi detectada em 20% de SqCC e substancialmente maior nos casos mostrando características condilomatosas no epitélio adjacente.

Adenocarcinomas mostram reatividade para queratinas de baixo peso molecular, antígenos de membrana epitelial, CEA e componentes secretórios. A expressão de queratina 7 tem sido tomada como evidência de diferenciação glandular no carcinoma de pulmão. Pode haver em algumas situações co-expressão de queratina e vimentina. Células de Langerhans S-100 positivas são frequentes no estroma tumoral. Em cerca de metade dos casos há positividade para apoproteínas do surfactante pulmonar, uma característica altamente eficaz no diagnóstico diferencial com outros tipos de carcinoma de pulmão e, mais importante, com adenocarcinomas metastáticos. Catepsina B e componentes da membrana basal são também encontrados. Adenocarcinomas de pulmão mostram ainda consistente expressão de antígenos Lewis X e Y dos grupos sanguíneos, característica esta de valor também no diagnóstico diferencial. Hiperexpressão de produtos gênicos supressores tumorais, como p53, nos adenocarcinomas de pulmão, tem sido especificamente associada com o tabagismo e expressão de carcinogênese precoce para adenocarcinomas. A detecção de ativação de oncogenes K-ras em tabagistas formais com adenocarcinomas de pulmão sugere que mutações K-ras constituem um evento precoce e irreversível no desenvolvimento deste tipo de tumor. Mutações de K-ras também ocorrem em hiperplasias bronquioalveolares atípicas, expressão esta tida como indicador de mau prognóstico. Adenocarcinomas metastáticos do trato digestivo (CK20+; CK7-) nos pulmões (CK20-; CK7+) podem ser diferenciados pela expressão de queratinas de baixo peso.

Diferenciação neuroendócrina – Múltiplos polipeptídeos são produzidos pelo câncer de pulmão, particularmente SCC. O Quadro 4 lista os marcadores neuroendó-

QUADRO 4
Imunistoquímica dos marcadores neuroendócrinos em câncer de pulmão

Marcadores	SCC	NSSC
L-dopa descarboxilase	48-82%	12-33%
Cromogranina-A	48-93%	0-28%
Enolase	93-100%	27-57%
Bombesina (GRP)	20-69%	1-17%
Sinaptofisina	43-88%	10-28%
Leu-7	59-89%	16-44%

crinos observados em SCC e NSSC. Heterogeneidade de expressão existe. Fenótipo neuroendócrino é tipicamente definido como expressão de dois ou mais marcadores listados no Quadro 1. Por essa definição, 75% dos SCC e 20 a 25% dos NSSC têm fenótipo neuroendócrino. Em NSSC, alguns estudos têm mostrado que fenótipo neuroendócrino associa-se com melhor resposta à quimioterapia e melhora na sobrevida⁽³⁶⁻³⁸⁾.

FATORES PROLIFERATIVOS

Há vários métodos de coloração dos núcleos com o intuito de determinar atividade proliferativa celular incluindo: coloração imunistoquímica para detecção do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e Ki-67, coloração histoquímica para regiões nucleolares organizadoras (AgNORs). O PCNA é uma proteína ácida nuclear de 36kD envolvida na síntese de DNA. Em cortes fixados pela formalina e embebidos na parafina, o anticorpo monoclonal PC10 contra PCNA cora os núcleos das células na fase S, G1 tardia e G2 precoce. Alta imunexpressão de PCNA correlaciona-se com aneuploidia, Ki-67 expressão, fase-S de tumores aneuploides e índice de mitoses em carcinomas não-pequenas células de pulmão linfonodos negativos⁽³⁹⁾. Todavia, PCNA não foi um marcador importante de sobrevida em análise univariada e multivariada de carcinomas não-pequenas células de pulmão⁽⁴⁰⁾.

Estudos mostram que expressão de Ki-67 pode ser um útil marcador para sobrevida em carcinomas, operáveis, não-pequenas células⁽⁴¹⁾. Todavia, a análise de múltiplos parâmetros em carcinomas de células não-pequenas não mostrou correlação entre expressão de Ki-67 e ploidia de DNA, fase-S ou tipo histológico^(40,42-44).

Apesar de não ser uma reação imunistoquímica, AgNORs pode ser uma medida da atividade de proliferação nuclear. As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são constituídas por segmentos de DNA que contêm os genes para a produção do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) e representam os nucléolos celulares. Usando-se uma técnica de impregnação com a prata, estas estru-

turas são visualizadas à microscopia óptica como pontos escuros (AgNOR). O número e a área de NORs no núcleo são relacionados com a síntese de proteínas e, portanto, as NORs expressam-se mais nos tumores de alto grau. Recentemente, Antonângelo *et al.*⁽⁴⁵⁾ demonstraram que pacientes com carcinomas de células escamosas com baixa expressão de AgNOR apresentam maior sobrevida quando comparados com os com tumores com alta expressão. Protocolos terapêuticos atualmente existentes dependem do estadiamento e da caracterização histológica do câncer de pulmão. Daí verifica-se a importância de um sistema de classificação no reconhecimento dos vários tipos histológicos. A classificação universalmente aceita como padrão de referência é a da Organização Mundial de Saúde⁽¹⁴⁾, que se baseia em dados obtidos a partir da microscopia de luz. Esta classificação reconhece quatro tipos maiores de câncer de pulmão: carcinoma de células escamosas (epidermóide), carcinoma de células pequenas (*oat-cell*), adenocarcinoma, carcinoma de grandes células (anaplásico). Além de toda subjetividade, pertinente a qualquer sistema classificatório, outro grande problema a se levar em conta diz respeito à representatividade do material. Em grande número de casos, esse evento possibilita apenas que neoplasias sejam grosseiramente separadas em *oat-cell* e não *oat-cell*, por exemplo. A experiência adquirida com o estudo de fatores de prognóstico no câncer de pulmão por Capelozzi *et al.*^(16,29-33) faltava ainda ser completada pela demonstração da utilidade da morfometria e histoquímica na rotina diagnóstica. Esta demonstração pode ser alcançada aplicando as mesmas técnicas em uma série diferente de tumores, proveniente de outro centro de estudo. Essa idéia resultou em trabalho, no qual o objetivo em questão era verificar o papel do AgNOR no comportamento dos carcinomas de células não-pequenas de pulmão operados, através da expressão nas células do tumor primário e metástases linfonodais. O estudo mostrou-nos que a expressão do AgNOR é útil em prever comportamento de carcinomas de células não-pequenas em estágio precoce (I e II). O estudo mostrou também que não há diferenças na expressão entre os tumores primários e metastáticos, sugerindo que mecanismos de atividade proliferativa da célula tumoral no câncer de pulmão podem não ter influências nas metástases⁽⁴⁶⁾.

PLOIDIA CELULAR (DNA)

Há muitas controvérsias na literatura para o estudo da ploidia celular nos tumores de pulmão. Em estudo recente, Bernardi *et al.*⁽⁴³⁾ demonstraram que carcinomas de células escamosas aneuplóides apresentaram menor sobrevida que os tumores diplóides/tetraplóides. Contudo, no mesmo trabalho, quando se incluíram no estudo outros marcadores de prognóstico, apenas a expressão das

proteínas nucleolares (NORs) mantiveram correlação com a sobrevida.

BIOLOGIA MOLECULAR

Aplicação de técnicas em biologia molecular tem resultado em melhor entendimento dos eventos genéticos que contribuem para a carcinogênese, crescimento tumoral, invasão e metástases no câncer de pulmão. Proliferação celular normal é controlada por um grupo de eventos celulares coordenados regulados por uma expressão balanceada de múltiplos genes e produtos gênicos. A carcinogênese é um processo de múltiplos passos, através do qual uma série de eventos resulta em um desequilíbrio de proto-oncogenes ativados e genes supressores, que conduzem à transformação celular, autonomia, e crescimento celular incontrolado. Estes eventos carcinogênicos podem ocorrer sob influência de exposição aos carcinógenos e fatores inerentes ao hospedeiro ao longo do tempo em sucessivos passos envolvendo a transformação de múltiplos genes.

Marcadores moleculares são potencialmente úteis para detecção precoce, monitorização de resposta terapêutica, preditores de potencial metastático e prognóstico, posteriormente contribuindo na etiologia e carcinogênese do câncer de pulmão. Como os eventos moleculares da carcinogênese pulmonar, invasão e metástases podem ser melhor compreendidos, novas estratégias terapêuticas poderão ser desenvolvidas.

A biologia molecular do câncer de pulmão é dividida em: 1) carcinogênese e 2) invasão e metástases.

Carcinogênese – Do ponto de vista biológico, o câncer de pulmão é a expressão fenotípica do acúmulo de alterações genéticas ao longo das células epiteliais de revestimento das vias aéreas. Estas alterações genéticas resultam em proliferação celular incontrolável por interferência no ciclo celular ou inibição da morte celular programada (apoptose). Dessa forma, o avanço no conhecimento das causas de proliferação celular poderá trazer importantes implicações no diagnóstico precoce e no estabelecimento de novas estratégias terapêuticas. O conhecimento dos fatores genéticos e moleculares envolvidos na carcinogênese pulmonar iniciou-se em 1960 com a citogenética. Sofreu grande avanço em 1980, com o conhecimento dos oncogenes envolvidos e atingiu o ápice em 1990, com a identificação dos genes supressivos tumorais (oncogenes recessivos ou antioncogenes). Tais fatores genéticos, que interferem com o ciclo celular ou apoptose, potencialmente influenciados por fatores ambientais, como o fumo e a poluição, têm permitido melhor compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares no desenvolvimento do câncer de pulmão. Portanto, a análise de tais fatores permitirá compreender os efeitos

resultantes no tratamento com novos agentes, tipos histológicos, diagnóstico, riscos de recidiva e sobrevida.

Suscetibilidade genética ao câncer de pulmão – Estudos epidemiológicos têm demonstrado que algumas formas de câncer são comuns em famílias, sugerindo que a suscetibilidade ao câncer pode ser herdada. Já o câncer de pulmão é mais comumente tido como uma forma de câncer determinada apenas pelo ambiente (fumo, minerais de urânio). Contudo, com base em evidências clínicas, diferentes graus de suscetibilidade para a formação de tumores devido a agentes ambientais têm sido postulados. Evidências epidemiológicas para aumento do risco familiar de câncer do pulmão foram notadas em 1960. No maior estudo até o momento, risco de 2,4 para câncer de pulmão foi identificado em parentes de pacientes com câncer de pulmão⁽⁴⁷⁾. Este risco familiar é suportado por recentes dados colhidos na população de Utah⁽⁴⁸⁾. Identificou-se tendência familiar ao câncer de pulmão, sendo que as mulheres jovens não fumantes apresentam risco maior do que os homens. Estudos genealógicos dessas famílias sugerem um caráter co-dominante de herança mendeliana transmitida através de um gene autossômico raro. Esse modelo sugere que portadores desse gene desenvolvem câncer de pulmão precocemente, com risco 2.245 vezes maior em indivíduos homocigotos não fumantes.

Alterações genéticas adquiridas – ONCOGENES – Nem todo câncer de pulmão tem a herança familiar de base. Dessa forma, tumores esporádicos ou de causa não familiar não são devidos a mutações nas linhagens germinativas ou a um gene de suscetibilidade ao câncer, resultantes de transmissão por herança, mas sim devidos a alterações genéticas somáticas adquiridas. A primeira evidência convincente de que o câncer poderia ser decorrente de elementos genéticos não herdados foi a observação por Rous, em 1911, de que filtrados celulares de um sarcoma de galinha poderiam induzir sarcomas em outras galinhas. Demonstrou-se que o potencial oncogênico de um vírus, o vírus do sarcoma Rous, era resultante de um gene celular mutante específico chamado v-src. Assim, a partir da identificação desse oncogene, mais de 50 diferentes oncogenes têm sido implicados no desenvolvimento do câncer humano. Oncogenes são derivados de genes celulares normais chamados proto-oncogenes. A proteína codificada resultante de um proto-oncogene tem papel importante na regulação do crescimento celular. A ativação dos oncogenes pode resultar de mutação, translocação cromossômica, amplificação e desregulação na transcrição, resultando na produção de uma proteína anormal ou na hiperprodução de proteínas normais. Agora esses proto-oncogenes ativados são chamados de oncogenes e suas proteínas codificadas, de oncoproteínas.

Nomenclatura: Proto-oncogenes e oncogenes são denominados por três letras em itálico (p.e., *myc*). As mesmas três letras não itálicas e começando com maiúscula designam as proteínas codificadas (p.e., *Myc*). O prefixo *v*, como em *v-src*, refere-se a um oncogene de origem viral. Ao proto-oncogene correspondente é dado o prefixo *c* (*c-src*).

Em sua forma ativada, os oncogenes propiciam um crescimento exacerbado para a célula que os expressa. Observações laboratoriais, clínicas e epidemiológicas sugerem que há necessidade de vários eventos genéticos ou bioquímicos para transformar as células normais em células neoplásicas. Portanto, acúmulos sucessivos de eventos críticos em uma população celular com crescimento exacerbado resultam em carcinogênese. Uma vez que a célula normal se tenha transformado em célula neoplásica (i.e., crescimento incontido), outros eventos são requeridos para que as células malignas proliferem com sucesso, principalmente a provisão de novos vasos nutrientes (angiogênese), para então criar um microambiente favorável ao crescimento. A interação entre as alterações genéticas nos núcleos celulares e as alterações necessárias para o microambiente celular, tais como suprimento vascular, nutrição e matriz extracelular, estão começando a ser estudadas. A inter-relação entre esses fatores pode exercer papel crítico nos vários graus de malignidade de um câncer.

Cinco categorias de proto-oncogenes são descritas:

- ⇒ fatores de crescimento,
- ⇒ receptores para fatores de crescimento ou hormônios,
- ⇒ tradutores de sinais intracelulares,
- ⇒ fatores de transcrição nuclear
- ⇒ proteínas controladoras do ciclo celular

Alterações moleculares – ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS – Alterações cromossômicas são informativas em tumores à medida que elas apontam para uma área específica a ser examinada no genoma à procura de mutações ou perda da informação genética para o controle regulatório do crescimento. Inicialmente, alterações cromossômicas foram identificadas ao exame dos cromossomos em uma célula em divisão ao microscópio de luz. Esta tarefa, conhecida como citogenética, foi o início da compreensão genética de muitas alterações malignas e teve início com a identificação do cromossoma Philadelphia, em 1960. No câncer de pulmão, alterações citogenéticas ou do cariótipo em carcinomas de pequenas células (CPC) têm sido repetidamente demonstradas, com deleções no braço curto (p) do cromossomo 3 (3p), especificamente 3p21-25, sugerindo um gene supressor tumoral neste sítio. Também têm sido identificadas perdas citogenéticas do braço longo (q) do cromossomo 5 (5q21), 13 (13q14) e 17 (17q13), estes dois últimos sítios contendo o locus su-

pressor para os genes Rb e p53. Adicionalmente, nos carcinomas de células não-pequenas (CCNP) numerosas anormalidades genéticas têm sido vistas através de estudos citogenéticos, mais freqüentemente em 3p14, 3q21, 19q13, 11p15, 1q11, 7q11, 1q21, 3p23 e 3p21, sendo que até o momento não foram ainda identificados os genes envolvidos em tais áreas.

Há duas classes de oncogenes: oncogenes dominantes e os oncogenes recessivos (ou genes tumorais supressores). Oncogenes dominantes são facilmente identificados, uma vez que eles têm um efeito genético dominante em converter uma célula não-transformada em uma célula transformada (maligna). Nessas circunstâncias, somente um de seus dois alelos portador de um gene específico necessita ser afetado. Evidências de uma segunda classe de genes ativos na carcinogênese – oncogenes recessivos ou genes supressores tumorais – têm sido mais difíceis de estabelecer. A evidência mais antiga da existência de genes tumorais supressores na carcinogênese advém de estudos genéticos em células somáticas através da fusão de células normais e neoplásicas. Surpreendentemente, as células híbridas resultantes não foram neoplásicas, um achado não esperado, caso um oncogene dominante estivesse envolvido. Se a transformação fosse devida a um oncogene suprido por um dos membros do híbrido, a presença de informação genética normal suprida pelo outro membro deveria não ter efeito na transformação. Essa observação conduziu à noção de que a célula neoplásica havia perdido a informação genética de ambos os alelos paterno e materno de locus genético crítico, que por sua vez foi substituído pela célula normal no híbrido.

Retinoblastoma – Outra evidência para a existência de genes supressores tumorais foi fornecida por estudos de genética e história natural em tumores pediátricos, particularmente, no retinoblastoma. Foi proposto que o desenvolvimento do retinoblastoma poderia ser explicado pela aquisição de duas mutações (i.e., uma mutação em ambos os alelos do mesmo locus genético). Para cada gene do locus, o genoma humano tem duas cópias gênicas, uma materna e outra paterna. Uma mutação foi proposta estar presente em uma linha germinativa de um dos pais e, portanto, anormal em todas as células somáticas do filho afetado ao nascimento. Com a aquisição de uma segunda mutação no alelo normal remanescente, a proteína codificada pelo gene afetado tornou-se funcionalmente inativa e a célula retinoblástica sofreu transformação maligna. Após elegantes análises citogenéticas e moleculares, foi determinado que um alelo do gene do retinoblastoma (Rb) foi inativado na forma herdada do retinoblastoma, de acordo com a hipótese prévia. Com a inativação do outro alelo do retinoblastoma, um retinoblastoma desenvolveu-se.

As categorias maiores de genes oncogenes (dominantes) e supressores recessivos são reconhecidos na carcinogênese pulmonar. Somente uma mutação é necessária

para um oncogene dominante causar câncer, enquanto genes supressores são considerados recessivos desde que mutações afetem o par de genes para a carcinogênese ocorrer. Mecanismos moleculares de ativação de oncogenes incluem: amplificação, mutação de ponto, translocação e hiperexpressão de uma transcrição ou proteína. Com genes supressores, a mutação inicial é, freqüentemente, mutação de ponto ou outra pequena alteração, resultante em inativação ou alteração de uma cópia do gene. A segunda alteração genética é uma alteração maior, tal como deleção ou translocação no DNA do cromossomo complementar, resultando em perda da heterozigose para o gene supressor. Como resultado, o produto do gene supressor é tanto não funcional ou completamente perdido. O último efeito é a perda da supressão tumoral que potencializa a carcinogênese.

Oncogenes dominantes – Um oncogene é um gene normalmente envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular, nas quais uma alteração poderá acionar o gatilho da carcinogênese. Estes genes estão presentes em células normais (proto-oncogenes) e codificam as proteínas celulares, tais como fatores de crescimento, quinases protéicas, proteínas envolvidas na sinalização de membrana e proteínas nucleares que regulam a expressão gênica. Muitos oncogenes, tais como K-ras (*Kirsten murine sarcoma virus*), foi primeiro identificado como o homólogo celular normal de genes transformadores agudos de vírus tumorais RNA. Outros oncogenes, tais como L-myc em carcinomas de pequenas células, não relacionados a vírus, mas são identificados porque consistentemente amplificados em tumores de ocorrência natural. Os oncogenes dominantes identificados no câncer de pulmão são descritos a seguir.

Família Myc – A família *myc* de proto-oncogenes inclui proteínas nucleares que têm propriedades de ligar DNA e com função ativa na regulação da transcrição. Há três membros desta família, c-myc (cromossomo 8q24), N-myc (cromossomo 2p23-24) e L-myc (cromossomo 1p23). Ativação desta família de proto-oncogenes no câncer de pulmão ocorre por amplificação e superprodução de produtos protéicos normais. Amplificação dos membros desta família tem sido encontrada no carcinoma de pequenas células. Os genes *myc* codificam três fosfoproteínas nucleares relacionadas especificamente ao ciclo celular. Clinicamente, a amplificação do gene c-myc tem sido associada ao curso mais maligno nos carcinomas de pequenas células. A hiperexpressão dos genes N-myc nos carcinomas de pequenas células tem sido correlacionada à pouca resposta à quimioterapia. A compreensão destas anormalidades tem levantado a possibilidade de terapêuticas dirigidas contra o gene c-myc. A exposição de uma linhagem de células de carcinomas de pequenas células

expressoras do gene L-myc a um DNA anti-L-myc inibe o crescimento celular de forma dose-dependente, sugerindo talvez uma oportunidade terapêutica. Amplificação dos genes myc também ocorre em carcinomas de células não-pequenas, principalmente c-myc, porém desprovida de significado clínico.

Família Ras – Há três proto-oncogenes ras: H-ras, K-ras e N-ras. Estes genes codificam proteínas ligadoras do grupo guanosina trifosfato (GTP), conhecidas como p21ras, que são funcionalmente relacionadas e têm semelhanças estruturais com as proteínas G. Estas proteínas localizam-se do lado interno da membrana celular e participam do sinal de transdução. Pontos de mutações específicas K-ras são relativamente comuns em CCNP, especificamente nos adenocarcinomas. Estas mutações resultam em uma única modificação no aminoácido da proteína, levando a marcada redução na atividade da GTPase intrínseca, permanecendo a proteína em estado ativo de ligação com a GTP, que impede a sua liberação. Uma vez adquiridas, estas mutações parecem ser estáveis, permanecendo tanto no tumor primário quanto nas metástases, como acontece com a maioria das mutações genéticas. Mutações dos genes H-ras e N-ras são raras em câncer de pulmão humano. Como cresce a sensibilidade dos ensaios, a incidência de mutação K-ras continua a aumentar, ocorrendo em mais de 56% dos casos de câncer de pulmão.

Mutações do gene K-ras têm sido detectadas em biópsias brônquicas de indivíduos fumantes sem evidências de câncer de pulmão⁽⁴⁹⁾, podendo ainda ser encontradas em esfregaços de escarro anos antes do diagnóstico clínico de câncer de pulmão⁽⁵⁰⁾, levantando a possibilidade de seu uso como marcador de pré-malignidade. Adicionalmente, exames da distribuição das mutações K-ras em tumores já estabelecidos sugerem que estas alterações ocorrem precocemente no desenvolvimento da neoplasia⁽⁵¹⁾.

O carcinógeno determinante das mutações K-ras é desconhecido, mas tem sido intimamente associado com a exposição ao fumo⁽⁵²⁾. Não está estabelecido se este é um fator causal ou meramente uma associação. Clinicamente, a presença de mutação K-ras em um adenocarcinoma é um potente indicador de pouca sobrevida⁽⁵³⁾. A presença desta discreta alteração molecular tem conduzido ao desenvolvimento de novos protocolos de tratamento. Crescimento tumoral em linhagens celulares expressando mutações K-ras é marcadamente diminuído por um anti-RNA K-ras construído através da introdução de um vetor retroviral⁽⁵⁴⁾. Dessa forma, melhor compreensão dessa alteração molecular no câncer de pulmão tem conduzido ao reconhecimento de um importante fator prognóstico negativo, um possível marcador de pré-malignidade e uma nova estratégia terapêutica.

Proteína Ras – O produto protéico do gene ras (p21ras) tem sido também demonstrado como um importante fator prognóstico na definição de sobrevida em CCNP⁽⁵⁵⁾. Pacientes cujos tumores têm altos níveis de expressão de p21ras têm sobrevida inferior em relação àqueles cujos tumores são p21ras negativos. De grande interesse é a observação recente de que inibidores da atividade p21ras podem trazer uma estratégia viável no tratamento por interferir com a modificação lipídica da molécula. Com o uso de inibidores da farnesiltransferase (FTI276), o crescimento de um câncer de pulmão humano com mutação K-ras foi inibido em animal de maneira dose-dependente⁽⁵⁶⁾.

Genes tumorais supressores

Gene retinoblastoma – O gene retinoblastoma, localizado no 13q, foi o primeiro gene supressor tumoral identificado, traduzindo sua importância na gênese do retinoblastoma hereditário. Ele codifica uma fosfoproteína nuclear 105,000-Da (pRB), que é uma reguladora da divisão celular. O estado de fosforilação da pRB é a chave para a progressão celular através do ciclo celular. pRB é subfosforilada em G1, é pesadamente fosforilada na fase G1 tardia antes da fase S, mas reverte a um estado subfosforilado antes da fase G0. pRB em seu estado subfosforilado liga-se à família E2F de fatores de transcrição, não permitindo a transcrição E2F-induzida de genes, importante para a progressão no ciclo celular. Isso resulta em um bloqueio de entrada na fase S, causando, em última análise, parada na divisão celular. A pRB isolada de tumores é freqüentemente mutada, resultando em uma proteína funcionalmente inativa incapaz de ligar E2F ou ser regulada por fosforilação, desta forma tornando desregulada a proliferação celular.

Defeitos no gene Rb ou na proteína pRB são quase universais em CPC mas são encontrados apenas em 30% dos CCNP. Não tem sido encontrada relação com a sobrevida. A importância central do pRB na regulação do crescimento tem sido mostrada por reconstituição do gene RB em linhagens CPC. Isso suprime seu crescimento, sem necessitar de correção de outras anormalidades genéticas. Este achado aponta para outra estratégia de tratamento.

Gene p53 – Inicialmente, p53 foi tido como um oncogene dominante, pelo fato de que a proteína p53 foi detectada em altos níveis em neoplasias malignas. Todavia, agora é corrente que o tipo selvagem p53 é um regulador do crescimento celular e mutações no gene p53 podem não produzir proteína p53 como produzi-la disfuncionalmente. A proteína mutante tem vida média muito mais longa do que o tipo selvagem, resultando em altos níveis vistos nas células transformadas. O gene p53 está localizado no cromossomo p17. Anormalidades no gene p53 são comuns em câncer de pulmão, usualmente como

ponto de mutação. A proteína codificadora (p53) é provavelmente um fator de transcrição nuclear e é um fator de supressão tumoral por mecanismos ainda não bem elucidados. p53 regula o crescimento celular na interface G1-S do ciclo celular e tem papel importante na indução da apoptose, ou da morte celular programada, em células com DNA lesado. Mutações em gene p53 parecem estar associadas com exposição a substâncias ambientais, como o fumo do cigarro. Anormalidades na expressão do gene p53 não parecem estar associadas com prognóstico em tumores pulmonares mistos, mas conferem um prognóstico pior em pacientes com adenocarcinomas estágio I. Tem sido demonstrado em modelos animais que o gene p53 tipo selvagem pode ser transduzido em esferóides tumorais de câncer de pulmão com um vetor retroviral. Se as células tumorais forem homozigotas para um mutante p53, não haverá inibição significativa do crescimento após transdução e expressão do p53 tipo selvagem, com a apoptose induzida no esferóide celular. Isso levanta a possibilidade de uma nova estratégia terapêutica em câncer de pulmão com mutação no gene p53.

Outros proto-oncogenes e oncoproteínas – Outros oncogenes no câncer de pulmão parecem exercer seus efeitos através da hiperprodução de proteínas codificadoras normais, sem necessariamente haver genes mutantes ou produção de proteínas anormais. A hiperprodução sugere um defeito regulatório na transcrição do gene ou na amplificação gênica. Os genes e produtos protéicos que comumente atuam dessa maneira são *c-erbB-1* e *c-erbB-2*, ambos quinases-tirosinas receptores.

c-erbB-1 – Este proto-oncogene ligado à membrana codifica um receptor de crescimento quinase-tirosina 170,000-Da, que é o receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR). O proto-oncogene, através de seu produto protéico, funciona no pulmão normal para estimular a proliferação celular epitelial e para promover a maturação das vias aéreas durante o desenvolvimento embrionário. Hiperexpressão do proto-oncogene tem sido encontrada em CCNP, especialmente o carcinoma de células escamosas, em 65 a 90% dos casos reportados. O uso da hiperexpressão do gene *c-erbB1* como marcador de prognóstico clínico é controverso, alguns estudos mostrando associação com pobre sobrevida e outros não.

c-erbB-2 – Este proto-oncogene pertence à família *c-erbB-1* de receptores ligados à membrana quinase-tirosina, portanto, está relacionado estruturalmente ao *c-erbB-1*. A proteína codificadora, chamada p185*c-erbB-2* ou HER2, também é expressa nas células epiteliais das vias aéreas do pulmão normal e tem um papel no crescimento e diferenciação do epitélio pulmonar normal. HER2 é coproduzida com EGFR em muitos adenocarcinomas de pulmão.

Fatores genéticos/hereditários no câncer de pulmão – Pacientes com síndrome de Fraumeni apresentam mutações na linhagem germinativa p53. Um significativo aumento no risco para câncer de pulmão é encontrado em pacientes com aumento na atividade da enzima p450 debrisoquina hidroxilase (medicação anti-hipertensiva); o gene para este fenótipo (CYP2D6) já foi clonado.

Fatores de crescimento – Proliferação de células tumorais ocorre sob influência de vários fatores de crescimento, que são tanto produzidos por células tumorais (autócrinas) ou células normais (parácrinas). Um dos primeiros fatores de crescimento autócrino em carcinomas de pequenas células foi o peptídeo liberador de gastrina (GRP), que também tem um efeito estimulatório do crescimento após ligação com receptores GRP nas células tumorais.

Invasão e metástases – Carcinogênese é somente o evento inicial do curso para malignização no câncer de pulmão. Após o desenvolvimento do câncer de pulmão segue-se uma série de eventos sucessivos, que incluem invasão, metástases e crescimento das metástases (Quadro 4). Semelhante à carcinogênese, cada evento está associado com alterações genéticas específicas que, por sua vez, resultam em desbalanço de fatores reguladores positivos e negativos. Antes de as metástases acontecerem, uma célula ou grupo de células deve desprender-se do tumor primário, penetrar no tecido adjacente, sobreviver e crescer no tecido do hospedeiro. Este acontecimento requer uma série complexa de eventos que incluem a entrada das células tumorais nos vasos, adesão ao sítio metastático, invasão no parênquima do órgão em questão, angiogênese e proliferação em sítio distante. O carcinoma de células escamosas é o único subtipo histológico conhecido a progredir através de estágio *in situ* para carcinoma invasivo. Esse fato requer interação com membrana basal subepitelial e envolve três passos: 1) aderência à membrana subepitelial, 2) criação de um defeito na membrana basal e 3) translocação das células tumorais através da membrana basal. Aderência das células tumorais envolve ligação entre as proteínas de superfície da célula tumoral às glicoproteínas, tais como laminina, colágeno IV e fibronectina. Essas ligações sofrem influências de várias moléculas de adesão, que incluem as integrinas, que representam uma família de glicoproteínas transmembranosas funcionantes como receptores de adesão. As células tumorais formam uma fenda na membrana basal pela produção de enzimas hidrolíticas ou estimulando as células do hospedeiro a produzir proteínases. Exemplos de enzimas proteolíticas incluem as metaloproteínases, tais como as collagenases IV, proteases séricas, como a uroquinase, e cisteína proteases, como as catepsinas B e L. Inibidores teciduais das metaloproteínases (TIMP)-1 e 2 são conhecidos reguladores collagenases-ne-

gativos. Translocação através de fendas na membrana basal é direcionada por substâncias quimiotáticas contidas nas células do hospedeiro ou fatores de motilidade produzidos pelas células tumorais. Angiogênese é outro fator importante ao permitir o crescimento tumoral, invasão e metástases; angiogênese pode ser inibida pelo TIMP. Os genes ou moléculas que participam na invasão tumoral e metástases são fatores reguladores de caráter positivo ou negativo.

Marcadores biológicos diagnósticos

Escarro, radiografia e tomografia computadorizada – É bem conhecida a alta morbidade e mortalidade do câncer de pulmão, o que torna esta doença significativa problema de saúde pública, mesmo com os avanços recentes ocorridos no tratamento.

Como causas importantes para a permanência de altos índices de mortalidade estão o potencial agressivo destas neoplasias, o diagnóstico em estádios avançados e a ausência de métodos eficazes para o diagnóstico precoce, principalmente nos indivíduos de alto risco.

Até o momento, a radiografia de tórax de rotina e a citologia oncótica do escarro fazem parte dos exames mais utilizados para selecionar os pacientes de alto risco.

Outro método que vem sendo sugerido por alguns autores para o diagnóstico precoce dos carcinomas de pulmão é a tomografia computadorizada na detecção de tumores pequenos, mostrando-se 600 vezes superior à radiografia, porém ainda não completamente aceita na prática pela ausência de estudos não-randomizados e alto custo para grandes populações.

Biologia molecular – Estudos moleculares recentes sobre a biologia do processo carcinogênico em tumores sólidos humanos têm sugerido novas abordagens para o diagnóstico precoce destas patologias. Esses novos conceitos baseiam-se no fato de que a carcinogênese ocorre após mutações progressivas em células pré-malignas, que posteriormente evoluem para o tumor invasivo e metastático.

Anormalidades morfológicas pré-malignas no epitélio brônquico de pacientes com alto risco para neoplasias pulmonares foram descritas já em 1957⁽³⁷⁾ e complementadas por estudos atuais em que anormalidades genéticas e epigenéticas associadas a estas alterações histopatológicas vêm sendo estudadas, com vistas a ser utilizadas como biomarcadores para detecção precoce de transformação celular⁽³⁸⁾.

ANORMALIDADES EPIGENÉTICAS – TESTE DA METILAÇÃO

Entre as anormalidades epigenéticas, a metilação de promotores gênicos tem sido reconhecida como eficiente mecanismo de supressão gênica, especialmente dos genes CDKN2A (p16) e MGMT, presentes em 100% dos pa-

cientes com carcinomas de células escamosas e, portanto, classificando tal teste como excelente estratégia para triagem em escarro, porém com limitações aos grandes laboratórios pela necessidade de ensaios de PCR de alta sensibilidade, o que não é viável para muitos laboratórios.

ANORMALIDADES GENÉTICAS – AMPLIFICAÇÕES, DELEÇÕES DE ALELO, MUTAÇÕES

Dentre as anormalidades genéticas, amplificações gênicas, deleções de alelo e mutações de ponto têm sido as mais comumente descritas em carcinomas pulmonares⁽³⁸⁾.

As amplificações gênicas, por exemplo, do HER-2/neu, são mais comumente associadas com estádios clínicos mais avançados⁽³⁹⁾ e, portanto, não são úteis como biomarcadores precoces. Do mesmo modo, as mutações de ponto, embora sejam freqüentes nos carcinomas invasivos, têm sido raramente observadas em lesões pré-malignas e em epitélio brônquico normal de fumantes⁽⁴⁰⁾. A mutação em p53, por exemplo, foi detectada em 33 a 70% dos carcinomas pulmonares invasivos; entretanto, é raramente descrita em lesões pré-malignas⁽⁴¹⁾ ou na mucosa brônquica de fumantes sem evidência de tumor de pulmão⁽⁴²⁾.

A deleção de alelos, fenômeno comumente documentado pela perda de heterozigose (PH), tem sido demonstrada tanto nos tumores invasivos quanto nas lesões pré-neoplásicas. Estas deleções podem ocasionar a perda de genes supressores tumorais e com isso favorecer o desenvolvimento de neoplasias⁽⁴³⁾. Algumas regiões cromossômicas, como os braços curtos dos cromossomos 3, 9 e 17, têm sido mais freqüentemente afetadas por deficiências nos tumores pulmonares. Nessas regiões estão localizados importantes genes relacionados com origem e progressão em cânceres humanos, como os genes FHIT (3p14.2, 44), WNT7a (3p25) e B-catenin (3p21.3, 45), o gene CDKN2A/p16 (9p21) e o gene TP53 em 17p13. Este último é o supressor tumoral mais comum nos cânceres humanos⁽³⁸⁾. Mao *et al.*⁽⁵⁰⁾ demonstraram PH nas três regiões cromossômicas supracitadas também em epitélio brônquico normal de indivíduos fumantes.

ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS – ANEUPLOIDIAS, DELEÇÕES

Além das alterações detectadas em nível genético, alterações numéricas como perdas ou ganhos de cromossomos também têm sido descritas nas neoplasias pulmonares e em lesões pré-malignas. Alterações cromossômicas numéricas ou aneuploidias⁽³⁸⁾ são conhecidas desde o início dos anos 80, tendo sido amplamente detectadas com o advento da citometria de fluxo. Esta detecta aneuploidias e estabelece suas correlações prognósticas. Evidências recentes sugerem que a aneuploidia reflète a instabilidade cromossômica nas células tumorais – característica dos tumores de pulmão.

Alterações cromossômicas como aneuploidias e deleções podem ser detectadas em células interfásicas através de ensaios de hibridização *in situ* com sondas de DNA marcadas por imunofluorescência, um teste designado como FISH. Este teste tem sido usado rotineiramente em laboratórios de patologia molecular e de citogenética clínica.

Métodos para detecção de anormalidades cromossômicas – Dentre os vários métodos para diagnóstico das anormalidades cromossômicas estão o clássico bandejamento cromossômico, cariótipo espectral (SKY) e o FISH interfásico. Técnicas clássicas apresentam dificuldades: cultivo das células de tumores pulmonares sólidos *in vitro* pode reduzir número de metáfases disponíveis, inviabilizando a análise; outras limitações: baixo índice mitótico, morfologia cromossômica de baixa qualidade, alta heterogeneidade e complexidade dos arranjos cromossômicos. As novas técnicas de cariótipo molecular, como o SKY, estão-se destacando como excelente método para pesquisá-las, não só em células tumorais como em epitélio normal ou em lesões pré-malignas de indivíduos fumantes.

Cariótipo espectral (SKI) – O cariótipo espectral ou SKY é um método de hibridização semelhante ao FISH, mas que utiliza um conjunto de sondas DNA que cobrem os 22 pares de autossomos e os cromossomos sexuais X e Y. As sondas específicas para cada cromossomo são marcadas com um fluorocromo ou uma mistura de vários fluorocromos. Após a hibridização, um filtro de interferência especial conjugado a um sistema computadorizado com *software* próprio captura a imagem da metáfase e transforma os múltiplos perfis espectrais em cores, de forma que cada cromossomo é “pintado” de uma cor diferente. O SKY, portanto, permite que, na avaliação de uma única célula, todos os cromossomos sejam estudados conjuntamente.

FISH interfásico – O FISH em células interfásicas, da mesma forma que o SKY, utiliza sondas com seqüências de DNA complementares às seqüências que se deseja estudar, exceto que tais seqüências são específicas para genes ou regiões cromossômicas. As sondas são marcadas com fluorocromos para permitir visualização no microscópio de fluorescência. A desvantagem do FISH é que, como sonda específica, é necessário conhecer o que se deseja estudar, para então escolher as sondas que serão específicas apenas para detectar tais alterações.

ANORMALIDADES DETECTADAS PELO FISH E SKY

Os métodos de hibridização *in situ*, como o FISH e o SKY, permitem identificar tanto as anormalidades cromossômicas numéricas, como as monossomias e trissomias, quanto estruturais, como as deleções e translocações.

Assim, por exemplo, tanto nas leucemias, quanto nos tumores sólidos, estes métodos têm-se mostrando mais sensíveis que a citogenética clássica.

Várias anormalidades já foram documentadas nos carcinomas pulmonares. A deleção do braço curto do cromossomo 3 foi detectada por FISH no carcinoma de pequenas células do pulmão e no epitélio brônquico de fumantes antes do aparecimento do câncer⁽⁴⁶⁾. Aneuploidia nos cromossomos 6, 7, 8, 9, 12, 17, 18 e Y também pode ser detectada pelo método do FISH em carcinomas, assim como cópias extras: polissomias do 7, 6, 12 e 17.

CONCLUSÕES – PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar do conjunto de anormalidades citogenéticas/moleculares observadas nas neoplasias pulmonares, não existem ainda testes citogenéticos para uso clínico no diagnóstico, por vários motivos: ausência de única alteração comum a todos os tipos de tumores ou grupo morfológico específico, heterogeneidade do trato respiratório e alterações presentes de forma focal, em que o escarro pode compensar, pois inclui células representativas de diversas áreas.

O FISH interfásico foi usado com sucesso na detecção do carcinoma de bexiga, através de um painel com quatro sondas de DNA, incluindo os cromossomos 3, 7 e 17 e seqüências do gene p16 em 9p2. Verificada a sensibilidade e especificidade desse painel nas células isoladas de urina, ele foi aplicado em mais de 200 pacientes com sensibilidade do FISH maior que a citologia para detecção do carcinoma urotelial.

No futuro, espera-se desenvolver um painel de sondas para detecção de câncer de pulmão em ensaio de FISH interfásico.

REFERÊNCIAS

1. Landisl. *Cancer stat* 1998;48:12-29.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1998. Rio de Janeiro: INCA/PRO-ONCO, 1998.
3. Ginsberg RJ, Vokes EE, Raben A. Cancer of the lung. In: Devita JR, et al, editors. *Cancer: principles and practices of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997;658-77.
4. Anelli A. Quimioterapia em câncer de pulmão de pequenas células. In: Younes RN, editor. *Tumores torácicos*. Rio de Janeiro: Meditors, 1997; 269-80.
5. Seregini E, Botti A, Bogni E, Bombardieri E. Tumour marker evaluation in patients with lung cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55 (Suppl 221):67-71.
6. Younes RN. Lung cancer: role of surgery in the treatment of non-small cell lung cancer stages I, II and III. *South Am J Cancer* 1997;1:153.
7. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111:1710-7.
8. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H, Nakayama H. Implications of staging lung cancer. *Chest* 1997;112:S242-8.

9. Johnson DH, Marangos PJ, Forbes JT. Potential utility of serum neuron-specific enolase level in small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1984;44:5409-14.
10. Antonangelo L, Bernardi FDC, Capelozzi VL, Takagaki T, Younes RN, Saldiva PH. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest* 1997;111:110-4.
11. Carey FA. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. *J Pathol* 1994;172:307-12.
12. Graham EA, Singer JJ. Successful removal of an entire lung for carcinoma of the bronchus. *JAMA* 1993;101:1371-4.
13. Kreyberg L. Main histological types of primary epithelial lung tumors. *Br J Cancer* 1961;15:206-10.
14. Histological typing of lung tumors, Vol. 1. 3rd ed. International Histological. World Health Organization. Histological typing of lung tumors. 3th ed. Geneva: World Health Organization, 1999;1 (International Histological Classification of tumors, 1).
15. Hinson KFW, Miller AB, Tall R. An assessment of the World Health Organization classification of the histologic typing of lung tumors applied to biopsy and resected material. *Cancer* 1975;35:399-405.
16. Delmonte Capelozzi V, Alberti O, Saldiva PH. Large cell carcinoma of the lung. Ultrastructural and immunohistochemical features. *Chest* 1986;90:524-7.
17. Rogli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity. A blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol* 1985;16:569-79.
18. Gatter KC, Dunnill MS, Pulford KAF, Heryet A, Mason DY. Human lung tumors. A correlation of antigenic profile with histological type. *Histopathology* 1985;9:805-23.
19. Capelozzi VL, Sheppard MN, Saldiva PHN. Modeling survival in neuroendocrine lung tumors based on clinical and morphometric data. *Chest* 1994;106(Suppl):76S.
20. American Joint Committee on Cancer. Lung. In: Bearhs OH, Henson DE, Hutter RV, Kennedy BJ, editors. Manual for staging of cancer. Vol. 4. Philadelphia: JB Lippincott, 1992;115-22.
21. Rosai J. Guidelines for handling of most common and important surgical specimens. In: Ackerman's surgical pathology. St Louis: CV Mosby, 1989;7:1908-11.
22. Barbuto JAM. Marcadores tumorais. In: Rentani MN, Coelho RG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editors. Bases da oncologia. São Paulo: Lemar, 1998;351-74.
23. Schwartz MK. Cancer markers. In: De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practices of oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1993;531-42.
24. Bagashawe KD, Rustin GJS. Circulating tumor markers. In: Perkhani M, Pinedo OH, Veronesi U, editors. Oxford textbook of oncology. Oxford: Oxford University Press, 1995;412-19.
25. Coombes RC, Dearnaley NP, Ellison ML, Neville AM. Markers in breast and lung cancer. *Ann Clin Biochem* 1982;19:263-8.
26. Gail MH, Eagan RT, Feld R, Ginsberg R, Goodell B, Hill L, et al. Prognostic factors in patients with resected stage I non-small cell lung cancer: a report of lung cancer study group. *Cancer* 1984;54:1802-13.
27. Takagaki TY. Marcadores tumorais em carcinoma broncogênico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1992.
28. Gross JL. Marcadores tumorais séricos em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1999.
29. Delmonte Capelozzi V. Câncer de pulmão. Oncogênese. *J Pneumol* 1987;13:35-50.
30. Capelozzi VL, Dewar A, Saldiva PHN, Sheppard MN. Morphometric characterization of typical carcinoid, atypical carcinoid, large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma of the lung based on ultrastructural and stereological procedure. *Chest* 1994;106(Suppl):90S.
31. Battlehner CN, Saldiva PHN, Carvalho CRR, Takagaki TY, Montes GS, Younes RN, et al. Nuclear/cytoplasmic ratio correlates strongly with survival in on-disseminated neuroendocrine carcinoma of the lung. *Histopathology* 1993;22:31-4.
32. Delmonte Capelozzi V, Battlehner CN, Montes GS, Saldiva PHN. Volume fraction of dense-core granules correlates well with survival in disseminated (stage IV) neuroendocrine carcinoma of the lung. *Pathology Pract Res* 1993;189:1145-8.
33. Bernardi FDC, Capelozzi VL, Takagaki T, Younes R, Saldiva PHN. Usefulness of morphometric evaluation of histopathological slides is useful in predicting long-term outcome of patients with squamous cell carcinoma of the lung. A preliminary report. *Chest* 1995;107:614-20.
34. Carvalho HA, Takagaki TH, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Stereological estimates of nucleus/cytoplasm ratio and star volume on fiber-optic biopsies are of prognostic value to discriminate survival after radiotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathology* 1997;31:420-9.
35. Caporino C, Saldiva PHN, Farhat CA, Takagaki TY, Younes RY, Capelozzi VL. Stereological estimates of nuclear star volume and vessels as predictors of chemotherapy response in small cell carcinoma of the lung. *Histopathology* 1999;35:257-66.
36. Gazdar AF, Kadoyama C, Venzon D. The association between histologic type and neuroendocrine differentiation on drug sensitivity of lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1992;13:191-6.
37. Graziano SL, Mazid L, Newman N. The use of neuroendocrine immunoperoxidase markers to predict chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1398-406.
38. Jorgensen L, Hirsch FR, Skov BG, Osterlind K, Cooper EH, Larsson LI. Occurrence of neuron specific enolase in tumor tissue and serum in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1991;63:151-3.
39. Macchiarini P, Pepe S. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992;70:1520-7.
40. Demarchi MF, Reis MM, Palomino SP, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, et al. Prognostic value of desmoplasia and the expression of PCNA, Ki67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Pathology* 2000;13:511-20.
41. Tungehar MF, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology* 1991;19:545-50.
42. Morkve O, Halvorsen OJ, Stangeland L, Gulsvik A, Laerum OD. Quantitation of biological tumor markers (p53, c-myc, Ki-67 and DNA ploidy) by multiparameter flow cytometry in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1992;52:851-5.
43. Bernardi FDC, Antonangelo L, Beyruti R, Takagaki T, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Clinical, pathological and biological markers of prognosis in surgically resected squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 1997;10:992-1000.
44. Demarchi MF, Reis MM, Palomino SP, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, et al. Prognostic value of desmoplasia and the expression of PCNA, Ki67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000;13:511-20.
45. Antonangelo L, Bernardi FDC, Capelozzi VL, Takagaki T, Younes RN, Saldiva PH. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar orga-

- nizer region in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest* 1997;111:110-4.
46. Rodrigues OR, Antonângelo L, Franco Filho EC, Capelozzi VL, Saldiva PHN. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in mediastinal lymph nodes metastasis and resected non-small cell lung cancer. *Jpn Assoc for Thorac Surg* 1996; 44(Suppl):260.
47. Ookawa K, Shiseki M, Takahashi R. Reconstitution of the RB gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene* 1993;8:2175-81.
48. Cannon-Albright LA, Thomas A, Goldgar DE. Familiarity of cancer in Utah. *Cancer Res* 1994;54:2378-85.
49. Clements Jr. NC, Nelson MA, Wymer JA. Analysis of K-ras gene mutations in malignant and nonmalignant endobronchial tissue obtained by fiber-optic bronchoscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152: 1374-8.
50. Mao L, Hruban RB, Boyle JO. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54:1634-7.
51. Li ZH, Zheng J, Weiss LM, Shibata D. C-k-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol* 1994;144: 303-9.
52. Husgafvel-Pursiainen K, Hackman P, Ridanpaa M. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Int J Cancer* 1993;53:250-6.
53. Kern JA, Slebos RJC, Top B. C-erbB2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Invest* 1994;93:516-20.
54. Zhang Y, Mukhopadhyay T, Donehower LA. Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. *Hum Gene Ther* 1993; 4:451-61.
55. Myamoto H, Harada M, Isobe H. Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer. *Cancer Res* 1991;51:6346-50.
56. Sun J, Qian Y, Hamilton AD, Sebu SM. Ras CAAX peptidomimetic FTI276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-ras mutation and p-53 deletion. *Cancer Res* 1995; 55:4243-7.

ERRATA

Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para a terapia biológica. *J Pneumol* 2002;28(3):143-149.

Por um lapso, deixaram de ser publicadas duas informações.

1) Do autor Fernando Azevedo Pacheco, a titulação completa correta é:

Mestrando em Pneumologia; Coordenador do Serviço de Pneumologia do Hospital Copa D'Or, Rio de Janeiro.

2) Na página 144, após o intertítulo "Antígeno carcinoembrionário (CEA)", há outro intertítulo após o 2º parágrafo: **p53**. Repetimos o texto, incluindo esse intertítulo:

p53

É um gene supressor que tem função na proteção da estrutura do DNA. Ele regula o ciclo celular, fazendo a célula estacionar o seu ciclo biológico até que as proteínas de reparo do DNA possam agir. Se as alterações genéticas forem de tal magnitude que o reparo seja impossível, o gene p53 inicia o processo de apoptose (morte celular programada)⁽¹⁰⁾. Mutações no gene p53 são as alterações genéticas mais frequentes no câncer de pulmão, e em alguns existe supressão molecular ou funcional do p53⁽¹¹⁾.