

Diferenciação neuroendócrina do carcinoma brônquico não pequenas células

Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung cancer

Cyro Teixeira da Silva Junior¹, Gilberto Perez Cardoso²,
Leticia Maciel dos Santos³, Mauro Zamboni⁴,
Rodolfo Fred Behrsin⁵

RESUMO

Introdução: parte dos carcinomas do pulmão do tipo não pequenas células (CPNPC) apresentam diferenciação neuroendócrina, confirmada pela imuno-histoquímica. Estes tumores são mais agressivos e apresentam disseminação mais precoce do que os que não têm essa característica. **Métodos:** estudo secundário resultante da revisão não sistemática a partir do estudo primário de Baldi e colaboradores. Análise de dados primários não publicados. A técnica imunohistoquímica utilizada foi feita por meio do método ABC padronizado. Os marcadores utilizados foram: cromogranina A; leu 7; enolase neuro-específica; serotonina; bombesina; calcitonina, ACTH; vasopressina, vimentina e anticorpos neurofilamentares. A sensibilidade dos marcadores tumorais se baseou na combinação em paralelo a partir de 200 amostras do CNPCP de tumores ressecados. Considerou-se estatisticamente significante o valor de p menor ou igual a 0,05. **Resultados:** a amostra era composta de 80 (40%) carcinomas escamosos; 85 (42,5%) adenocarcinomas; 30 (15%) carcinomas não pequenas células indiferenciados e 5 (2,5%) carcinomas adenoescamosos. A sensibilidade dos marcadores tumorais, utilizados em testes múltiplos paralelos, foi: cromogranina A - 32,1%; Leu 7 - 25%; NSE - 17,6%; serotonina - 16,6%; bombesina - 17,6%; calcitonina - 20%; ACTH - 30,5%; vasopressina - 21,2%; vimetina - 24,7% e anticorpos neurofilamentares - 22,4%. **Conclusão:** a cromogranina A, ACTH, Leu 7, vimetina e os anticorpos antifilamentares têm um rendimento semelhantes para o diagnóstico do carcinoma não pequenas células do pulmão, através da imuno-histoquímica.

Descritores: marcadores de tumor, marcadores de diferenciação, neoplasias pulmonares, carcinoma broncogênico.

ABSTRACT

Introduction: a portion of non-small cell lung carcinomas (NSCLC) which is still not completely characterized, has a neuroendocrine differentiation. The aim of this study was evaluated the sensitivity of neuroendocrine markers in non-small cell carcinomas by immunohistochemistry. **Methods:** analysis of not published primary date. Immunohistochemistry assays were performed by the standard ABC method with Cromogranin-A, Leu 7, neuron specific enolase (NSE), serotonin, bombesin, calcitonin, ACTH, vasopressin, vimentin and neurofilaments antibodies. Sensitivity of tumor markers was used in a parallel combination strategy from 200 specimens from patients with surgical resected NSCLC. Tests statistically significant with p less than or equal to 0.05. **Results:** eighty (40%) squamous carcinomas, 85 (42.5%) adenocarcinomas, 30 (15%) undifferentiated non-oat cell lung carcinoma and 5 (2.5%) adenosquamous carcinomas. Sensitivity of tumor markers used in a parallel multiple tests was Cromogranin-A (32.18%), Leu 7 (25.0%), NSE (17.6%), serotonin (16.5%), bombesin (17.6%), calcitonin (20.0%), ACTH (30.5%), vasopressin (21.2%), vimentin (24.7%) and neurofilaments (22.4%). Comparison between Cromogranin A with others markers showed ACTH, Leu 7, vimentin and neurofilaments with distribution not significant (p>0.05). **Conclusion:** cromogranin A, ACTH, Leu 7, vimentin and neurofilaments are similar to diagnostic neuroendocrine differentiation, by immunohistochemistry, in non-small cell lung carcinomas.

Keywords: tumor markers, lung neoplasm, carcinoma bronchogenic.

Introdução

O desenvolvimento da técnica da imuno-histoquímica permitiu comprovar que uma parcela dos carcinomas do pulmão não pequenas células (CPNPC), que apresentam diferenciação neuroendócrina, são mais agressivos e com disseminação mais precoce do que os que não apresentam essa diferenciação. A cura e a sobrevida dos pacientes portadores desses tumores estão associadas à sua ressecabilidade^{1,2}.

Estudos de Gazdar³ e colaboradores e de Silva Junior e Cardoso² concluíram que o fenótipo neuroendócrino associa-se a uma melhor resposta à quimioterapia e a uma melhora na sobrevida dos pacientes com carcinoma do pulmão não pequenas células (CPNPC).

A ordem decrescente de agressividade dos tumores neuroendócrinos do pulmão inclui: CPPC, carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNEGC), carcinóide atípico, carcinóide típico, *tumorlet* e hiperplasia celular neuroendócrina difusa. A diferenciação histopatológica convencional entre esses tumores, em alguns casos, é difícil. Estudos recentes indicam que somente a identificação das alterações genéticas são capazes de diferenciação, principalmente, entre CPPC e CNEGC⁴.

O estudo dos marcadores neuroendócrinos no soro ou líquidos biológicos, por diversas técnicas imunológicas, ou nos tecidos por imuno-histoquímica, é importante durante a etapa do estadiamento⁵. Junto do diagnóstico fenotípico, tais marcadores são capazes de diferenciar os tumores neuroendócrinos, do carcinoma da mama e do linfoma, uma vez que com frequência o diagnóstico deles se confundem quando realizados somente através do estudo histopatológico convencional⁶.

O objetivo do estudo foi avaliar quais marcadores são mais sensíveis para diagnosticar a diferenciação neuroendócrina, por imuno-histoquímica, em uma série de pacientes com CNPCP.

Material e métodos

Delineamento: estudo secundário, correspondendo a uma revisão não sistemática, conduzida a partir do estudo primário publicado por Baldi e colaboradores⁷.

Novos testes de imuno-histoquímica não foram realizados a partir da casuística de Baldi e colaboradores⁷ porque o delineamento é um estudo secundário. Somente delineamento com estudos suplementares acrescentam medições de um número pequeno de variáveis, para responder a uma nova hipótese de pesquisa.

Aspectos éticos e consentimento dos autores dos dados primários não foram considerados porque, segundo o livro de Hulley e colaboradores, no capítulo sobre Abordando Questões Éticas, "os estudos de registros, dados ou espécimes já existentes, são tipos de pesquisa isentos de revisão pelo Comitê de Ética em Pesquisa, desde que existam amostras disponíveis ao público"⁸.

Os dados primários de duzentas amostras de tecido de carcinomas brônquicos não pequenas células, oriundas de pacientes não tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, foram selecionados para a pesquisa. O subtipo histológico e a imuno-histoquímica para cromogranina A, Leu 7, enolase neurônica específica (NSE), serotonina, bombesina, calcitonina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), vasopressina, vimentina e neurofilamentos foram os marcadores avaliados entre os anos de 1998 e 1999.

A classificação histológica das diversas amostras estudada por Baldi e colaboradores⁷, foi baseada nos critérios publicados pela Organização Mundial de Saúde em 1981⁹.

A técnica de imuno-histoquímica utilizada pelos pesquisadores foi a denominada por método ABC padrão (complexo streptoavidina-biotina-enzima), que depois da reação entre os anticorpos primário, biotinilado "de fábrica", e secundário, adiciona-se à reação uma solução contendo complexos formados por uma molécula de avidina (proteína da clara do ovo), ligada a várias moléculas de biotina (vitamina B8), que, por sua vez são ligadas a moléculas de enzima. Como a avidina tem grande afinidade pela biotina, um sítio livre se liga à molécula de biotina do anticorpo secundário. Com isso, para cada interação anticorpo primário-anticorpo secundário, haverá diversas

1. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense. Disciplina de Pneumologia. TE SBPT.

2. Professor Titular do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal Fluminense. Doutor em Endocrinologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3. Aluna da Disciplina de Iniciação Científica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

4. Pneumologista do S. de Tórax do Hospital do Câncer – INCA/MS. Mestre em Medicina pela Universidade Federal Fluminense. TE SBPT.

5. Mestre em Pneumologia pela Universidade Federal Fluminense.

Trabalho realizado pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense Niterói Rio de Janeiro.

Endereço para correspondência: Cyro Teixeira da Silva Junior. Rua da Conceição 13/210 Centro 24020 080 Niterói – RJ. E-mail: ctsilvajunior@predialnet.com.br

Artigo recebido para publicação no dia 09/06/2004 e aceito no dia 29/06/2004, após revisão.

Tabela 1 – Sensibilidades isoladas dos marcadores de diferenciação neuroendócrina pesquisados pela técnica imuno-histoquímica (complexo streptoavidina-biotina-enzima) em 200 amostras de carcinoma brônquico não pequenas células por tipos histológicos.

Marcador	Escamoso (n = 80)	Adenocarcinoma (n = 85)	Adenoescamoso (n = 5)	Indiferenciado (n = 30)
Cromogranina A	7,5	24,7	0,0	56,6
Leu 7	6,25	18,8	0,0	36,6
NSE *	2,5	15,2	0,0	43,3
Serotonina	2,5	14,1	0,0	33,3
Bombesina	2,5	15,3	0,0	36,3
Calcitonina	2,5	17,6	0,0	26,6
ACTH **	8,25	22,3	0,0	33,3
Vasopressina	2,5	18,8	0,0	33,3
Vimentina	2,5	22,3	20,0	56,6
Neurofilamentos	2,5	20,0	20,0	56,6

Fonte: Baldi A, et al. *In Vivo* 2000;14:109-14.

* Enolase Neurônio Específica

** Hormônio Adrenocorticotrófico

Tabela 2 – Sensibilidades múltiplas paralelas dos marcadores de diferenciação neuroendócrina, pesquisados pela técnica de imuno-histoquímica (complexo streptoavidina-biotina-enzima), em 165 amostras de carcinoma brônquico não pequenas células dos subtipos escamoso e adenocarcinoma.

Marcadores	Sensibilidades com testes paralelos (%)
Cromogranina A	32,18
Hormônio adrenocorticotrófico	30,53
Leu 7	25,03
Vimentina	24,7
Neurofilamentos	22,4
Vasopressina	21,2
Calcitonina	20,0
Enolase Neurônio Específica	17,6
Bombesina	17,6
Serotonina	16,5

moléculas de enzima reagindo com o cromógeno e, conseqüentemente, amplificando a reação⁷.

Análise estatística: os dados de todos os casos descritos por Baldi e colaboradores⁷ foram transferidos para a planilha eletrônica do software *Microsoft Excel*®2000, com a finalidade de estudo estatístico descritivo¹⁰.

A sensibilidade isolada de cada marcador neuroendócrino foi calculada para cada subtipo histológico¹¹.

Para elevar a qualidade e otimizar o desempenho do diagnóstico para CPNPC, foi calculada a sensibilidade como teste múltiplo paralelo, para os subtipos histológicos escamoso e adenocarcinomas, utilizando a seguinte fórmula: $Tp+ = A+ \cup B+$. Usando linguagem de probabilidade de eventos, $Tp+$ é teste múltiplo em paralelo positivo. $A+$ representa o resultado positivo do teste A e $B+$ o resultado positivo do teste B. Denota-se por $A \cup B$, o evento união do teste A e do teste B. A sensibilidade combinada dos testes em paralelo foi calculada com auxílio de regras

de cálculo de probabilidade para a união de dois eventos independentes¹¹.

A análise estatística inferencial utilizada, e ainda não publicada por Baldi e colaboradores⁷, foi a comparação das sensibilidades múltiplas paralelas de cada marcador neuroendócrino com o exame mais sensível para o diagnóstico imuno-histoquímico de CPNPC escamoso e adenocarcinomas pelo teste não-paramétrico de qui-quadrado. Rejeitou-se uma hipótese alternativa com valor de $p \leq 0,05$. O programa *MedCalc* foi utilizado para tal finalidade.

Resultados

Dos 200 casos de carcinoma brônquico não pequenas células descritos no estudo original de Baldi e colaboradores⁷, 80 casos (40,0%) eram de carcinomas escamosos, 85 casos (42,5%) de adenocarcinomas, incluindo o subtipo bronquíolo-alveolar (20/85 – 23,5%), 5 casos de adenoescamoso (2,5%) e 30 casos (15,0%) de indiferenciados, incluindo de células gigantes (5/30) e *large cells* (25/30).

Os casos de carcinomas escamosos e adenocarcinomas contribuíram com 82,5% da amostra (165/200).

As sensibilidades isoladas dos diversos marcadores para diferenciação endócrina nos subtipos histológicos dos 200 casos de CPNPC, foram resumidas na tabela 1.

As sensibilidades múltiplas paralelas dos diversos marcadores para diferenciação endócrina nos 165 casos de CPNPC escamoso e adenocarcinomas estão descritas na tabela 2. Os resultados obtidos são as sensibilidades totais (múltiplas em paralelo) decorrentes dos cálculos das sensibilidades isoladas, considerando os dois tipos histológicos mais freqüentes na casuística.

A tabela 3 mostra a significância estatística das sensibilidades paralelas dos marcadores de

diferenciação neuroendócrina dos tipos histológicos escamoso e adenocarcinoma, após a comparação com o marcador mais sensível (cromogranina A).

Tabela 3 – Significância estatística das sensibilidades paralelas dos marcadores de diferenciação neuroendócrina dos tipos histológicos escamoso e adenocarcinoma após comparação com o marcador mais sensível (cromogranina A). Técnica imuno-histoquímica em 165 amostras de tecido pulmonar.

Marcador comparado com cromogranina A	Qui-quadrado	Valor de p
Hormônio		
adrenocorticotrófico	0,040	0,8411
Leu 7	1,720	0,1897
Vimentina	1,905	0,1676
Neurofilamentos	3,485	0,0619
Vasopressina	4,521	0,0335
Calcitonina	5,713	0,0168
Enolase neurônio específica	8,595	0,0034
Bombesina	8,595	0,0034
Serotonina	10,155	0,0014

Discussão

Dez a 20 % dos CPNPC demonstram diferenciação neuroendócrina, após avaliação com marcadores tumorais através da imuno-histoquímica ou de evidências ultra-estruturais na microscopia eletrônica¹².

De acordo com as recomendações da classificação da Organização Mundial de Saúde (1999), os tumores neuroendócrinos do pulmão devem ser vistos como uma classe separada em termos de diagnóstico imuno-histoquímico em material de biópsia, assim como em ressecções mais extensas¹³.

As técnicas de imuno-histoquímica detectam moléculas de antígenos teciduais. O mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo primário associado a diversos tipos de processos de visualização¹⁴.

O reconhecimento do antígeno por um anticorpo primário pode se dar de uma maneira direta ou indireta. Esses métodos fornecem uma marcação fraca devido à pequena quantidade de cromógeno depositado. Para amplificar a visualização da marcação pode-se utilizar outros métodos, assim como o complexo streptoavidina-biotina-enzima (ABC)¹⁴.

A principal desvantagem do complexo ABC é a possibilidade de resultado falso-positivo devido à presença de biotina endógena fisiológica em alguns tecidos: fígado, rim e músculo esquelético¹⁴.

Alguns autores concluíram que a técnica de Western blot foi mais sensível quando comparada com a imuno-histoquímica, para expressão de NSE, sinaptofisina e cromogranina A em tecidos com CPNPC¹⁵.

Testes múltiplos podem ser aplicados de duas maneiras: em paralelo - todos ao mesmo tempo ou em série, consecutivamente. A associação de testes eleva a qualidade do diagnóstico, diminuindo o número de resultados incorretos¹⁶.

Na análise estatística, a estratégia foi utilizar os testes múltiplos em paralelo porque assim aumenta-se a sensibilidade do diagnóstico a ser efetuado, apesar de diminuir a especificidade. Isto é, a possibilidade de omissão de uma doença é menor¹⁶.

Cabe ressaltar que um teste com alta sensibilidade deve ser usado quando a prevalência da doença é alta (doença comum), mesmo que o teste tenha relativamente baixa especificidade¹⁶.

O grau em que a sensibilidade aumenta depende da extensão em que os testes identificam pacientes com a doença não detectada pelos outros testes utilizados¹⁵.

Na casuística de Baldi e colaboradores⁷ o tipo histológico mais freqüente foi o adenocarcinoma - 42,5% (85/200), seguido pelo tipo escamoso em 40% (80/200), indiferenciado não pequenas células em 15,0% (30/200) e adenoescamoso em 2,5% (5/200).

Pesquisa publicada recentemente com casuística de 67 pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, no Rio de Janeiro, relatou as seguintes freqüências de tipo histológico do carcinoma brônquico¹⁷: escamoso (45,0%); adenocarcinomas (21,0%); pequenas células (18,0%); grandes células (4,0%); carcinóide (3,0%) e carcinoma não-pequenas células (9,0%).

Na casuística de Graziano e colaboradores¹⁸, espécimes patológicas de pulmão com CPNPC foram analisadas, por imuno-histoquímica, para NSE, cromogranina A, Leu 7 e sinaptofisina, além de p53 e HER2, com o objetivo de correlação entre a expressão do marcador tumoral e sobrevida dos pacientes. Concluíram que a sensibilidade para NSE foi de 38%, Leu 7 de 2%, cromogranina A de 0% e sinaptofisina de 5%. Concluíram também, após análise multivariada, que a expressão dos marcadores neuroendócrinos estudados, assim como p53 e HEH2, não possuíam fatores preditivos para resposta à quimioterapia isolada ou combinada à radioterapia em pacientes com CPNPC no estágio III.

Ouyang e colaboradores¹⁵, porém, mencionam que a diferenciação neuroendócrina pode ser um dos fatores do efeito da quimioterapia nos CPNPC. Hiroshima e colaboradores¹⁹, sugerem que além da diferenciação neuroendócrina, a invasão vascular pelo tumor também pode predizer o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma, isto é, o estadiamento

e o tipo histológico, permanece como mais um preditor de prognóstico^{20, 21}.

No estudo utilizado para a presente pesquisa⁷, a sensibilidade da NSE, Leu 7 e cromogranina A, foi de 17,0%, 25,0% e 32,0%, respectivamente, para espécimes histopatológicas de CPNPC.

Correlações entre os níveis de NSE e antígeno carcinoembrionário (CEA) são importantes para discriminar CPPC puro de formas mistas. A produção de CEA tende a ser mais elevada em células tumorais com baixos níveis de NSE²².

Análise da tabela 1 mostrou que porções de todos os subtipos histológicos dos CPNPC foram positivos para algum dos marcadores neuroendócrinos pesquisados.

Análise da tabela 2 concluiu que, para a mesma prevalência da doença, as sensibilidades múltiplas paralelas aumentaram o valor de cada marcador neuroendócrino testado individualmente. Cromogranina A foi o marcador mais sensível testado em paralelo.

Análise da tabela 3 concluiu que os marcadores mais sensíveis para diagnosticar diferenciação neuroendócrina, por imuno-histoquímica, em pacientes com carcinoma brônquico não pequenas células são: cromogranina A, Leu 7, ACTH, vimentina e neurofilamentos.

Ulbrich-Kulczynski²³, em pesquisa de grande importância realizada no Pavilhão Pereira Filho, Porto Alegre, concluiu, entre outros dados, que “a prevalência da positividade para cromogranina A, considerada na literatura um bom marcador para avaliar diferenciação neuroendócrina em CPNPC foi de 12,7 %”.

Baldi e colaboradores⁷ concluem em seu trabalho que uma neoplasia positiva para marcadores neuroendócrinos pode ser considerada como CPNPC com características neuroendócrinas, mesmo que não tenha na histologia convencional aparência das neoplasias neuroendócrinas do pulmão.

As informações decorrentes da presente pesquisa possuem relevância clínica e validade externa, sendo capazes de melhorar a vida dos pacientes, porque respondem de forma afirmativa às seguintes perguntas sugeridas por Slawson e Shaughnessy²⁴: a) informação está voltada para a solução de um problema específico? b) a intervenção proposta pelos resultados da investigação é factível? c) se a investigação é verdadeira, acarretará uma mudança significativa na prática clínica?

Segundo Wannmacher e Fuchs²⁵, por relevância clínica entende-se a avaliação de desfechos importantes para os pacientes derivados dos fatos em vez da “autoridade” ou de impressões da experiência clínica. Desfechos importantes

decorrentes do presente trabalho são: complementação diagnóstica da diferenciação neuroendócrina de um CPNPC durante o estadiamento e, avaliação em pesquisas com delineamentos próprios do impacto da diferenciação neuroendócrina na sobrevida dos pacientes.

A conclusão decorrente do trabalho foi que os marcadores mais sensíveis para diagnosticar diferenciação neuroendócrina, por imuno-histoquímica, em pacientes com carcinoma brônquico não pequenas células são: a cromogranina A, o Leu 7, o ACTH, a vimentina e a presença neurofilamentos.

Comentários

Existem três maneiras gerais para utilização de dados primários: análise de dados secundários, estudos suplementares e revisões sistemáticas. O uso criativo de dados existentes é uma forma eficaz para pesquisadores, com tempo e recursos financeiros limitados, começarem a responder questões de pesquisa importantes de forma rápida e eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zamboni M. Câncer do pulmão. In: Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado Rio de Janeiro. Pneumologia: Aspectos Práticos e Atuais. 1a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p.313-9.
2. Silva Junior CT, Cardoso GP. Endocrine expression in bronchogenic carcinoma. Rev Port Pneumol 2003;IX(2):109-15.
3. 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.
4. Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Haga Y, Toyozaki T, Iizasa T, Nakayama T, Fujisawa T, Ohwada H. Genetic alterations in early-stage pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Cancer 2004;100(6): 1190-8.
5. Silva Junior CT, Cardoso GP, Zamboni M. Marcadores de diferenciação endócrina para diagnóstico do carcinoma de pequenas células extra-pulmonares. Pulmão RJ 2004; 13(1):29-33.
6. Banner BF, Warren WH, Gould VE. Cytomorphology and marker expression of malignant neuroendocrine cells in pleural effusions. Acta Cytol 1986;30(2):99-104.
7. Baldi A, Groger AM, Esposito V, Di Marino MP, Ferrara N, Baldi F. Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung carcinomas. In Vivo 2000;14(1):109-14.
8. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D,

- Hearst N, Newman TB. Designing clinical research: an epidemiologic approach. Baltimore (USA): 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
9. World Health Organization. Histological typing of lung tumors. Geneva. WHO; 1981.
 10. Levine DM, Berenson ML, Stephan D. Statistics for managers using microsoft[®] Excel (Updated Version). 1a ed. New York: Prentice Hall Inc; 1998.
 11. Soares JF, Siqueira AL. Introdução à estatística médica. 2a ed. Belo Horizonte (MG): Coopmed; 2002.
 12. Pelosi G, Pasini F, Sonzogni A, Maffini F, Maisonneuve P, Iannucci A, Terzi A, De Manzoni G, Bresaola E, Viale G. Prognostic implications of neuroendocrine differentiation and hormone production in patients with Stage I nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003;97(10):2487-97.
 13. Muller KM. Neuroendocrine tumors of the lung. *Pathologie* 2003;24(4):297-302.
 14. Reis MM. Técnicas imuno-histoquímicas. In: Reis MM, editor. Testes imunológicos. 1a ed. Porto Alegre: AGE; 1998. p.52-4.
 15. Ouyang N, Chen G, Ding J. Detection of neuroendocrine differentiation in NSCLC and its clinical significance. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001;24(2):90-2.
 16. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. Clinical epidemiology: the essentials. Baltimore (USA): Williams & Wilkins; 1996.
 17. Duarte RLM, Paschoal MEM. Correlação entre a radiologia torácica e a broncofibroscopia em pacientes com suspeita de câncer de pulmão. *Análise de 67 exames. Pulmão RJ* 2003;12(2):66-70.
 18. Graziano SL, Tatum A, Herndon JE, Box J, Memoli V, Green MR, Kern JA. Use of neuroendocrine markers, p53, and HER2 to predict response to chemotherapy in patients with stage III non-small cell lung cancer: a cancer and leukemia group B study. *Lung Cancer* 2001;33(2-3):115-23.
 19. Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Toyozaki T, Haga Y, Fujisawa T, Ohwada H. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2002;73(6):1732-5.
 20. Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk R, Travis WD. Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* 2002;26(9):1184-97.
 21. Warren WH, Gould VE. Neuroendocrine tumors of the bronchopulmonary tract: a reappraisal of their classification after 20 years. *Surg Clin North Am* 2002;82(3):525-40.
 22. Kobayashi S, Okada S, Hasumi T, Sato N, Fujimura S. The significance of NSE and CEA as a differentiation marker for the cellular heterogeneity of small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med* 1999;189(1):37-49.
 23. Ulbrich-Kulczynski JM. Estudo imuno-histoquímico de 473 casos de carcinomas não de pequenas células do pulmão [tese]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
 24. Slawson DC, Shaughnessy AF. Obtaining useful information from expert based sources. *BMJ* 1997;314:947-9.
 25. Wannmacher L, Fuchs FD. Conduta terapêutica embasada em evidências. *Rev Assoc Med Bras* 2000;46(3):237-41. ■
-