

MANUAL DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA

EDITORES

Venâncio Avancini Ferreira Alves

Professor Associado
Departamento de Patologia
Instituto Adolfo Lutz e
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP

Carlos Eduardo Bacchi

Professor-Adjunto
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina
Campus de Botucatu
Universidade Estadual Paulista, UNESP

José Vassallo

Professor Doutor
Departamento de Anatomia Patológica
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP

MANUAL DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA

EDITORES

Venâncio Avancini Ferreira Alves

Carlos Eduardo Bacchi

José Vassallo

Proibida a reprodução total ou parcial deste livro
sem a permissão escrita da Sociedade Brasileira de Patologia

Manual de imuno-histoquímica / editores Venâncio Avancini Ferreira Alves,
Carlos Eduardo Bacchi, José Vassallo. – São Paulo : Sociedade Brasileira
de Patologia, 1999.

ISBN 85-87378-01-5

Vários colaboradores.

Bibliografia.

1. Imuno-histoquímica 2. Patologia I. Alves, Venâncio Avancini Ferreira.
II. Bacchi, Carlos Eduardo. III. Vassallo, José.

99-2103

CDD-616.079

NLM-QY 25

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA
GESTÃO 1997-1999

Diretoria Executiva (Biênio 1997/1999)

Presidente: Fernando Augusto Soares

Vice Presidente: Luiz Fernando Bleggi Torres

Secretário Geral: Gilles Landman

Secretário Adjunto: Marco Antônio Cardoso de Almeida

Tesoureiro Geral: Giulio Cesare Santo

Tesoureiro Adjunto: Alfredo Barbosa

Membro Nato: Marcello Franco

Departamentos

Assuntos Profissionais: Roberto Arcuri

Comunicação Social: Paulo Silvestre Faria

Científico: José Vassallo

Controle de Qualidade: Consuelo Antunes Barreto Lins

Informática: Renato Lima de Moraes Júnior

Ensino: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Ensino: Representante junto a CNRM: Ivânia Pimenta Gouvêa

Patologia Investigativa/Experimental: Luiz Antonio Rodrigues de Freitas

Secretaria da SBP

Carmen Sílvia Leite Varoli

Dirce Marforio

Sueli de Abreu Kurche

COLABORADORES

ALDA WAKAMATSU

Pesquisador Científico, Divisão de Patologia. Instituto Adolfo Lutz

CARLA PAGLIARI

Técnico de Apoio à Pesquisa, Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP

CARLOS E. BACCHI

Professor Adjunto, Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina. Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, UNESP

CRISTINA TAKAMI KANAMURA

Pesquisador Científico, Divisão de Patologia. Instituto Adolfo Lutz

CRISTIANE GOBBO CAÑÇADO

Residente de 3ª ano, Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina. Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, UNESP

EVANDRO SOBROZA DE MELLO

Professor Assistente, Departamento de Patologia. Universidade Federal de Santa Maria, RS

FERNANDA B.C. CAVALCANTE

Professor Assistente, Divisão de Anatomia Patológica. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP

FERNANDO AUGUSTO SOARES

Professor Doutor e Médico Patologista. Diretor do Departamento de Anatomia Patológica. Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo. São Paulo, SP

FERNANDO C. SCHMITT

Professor Visitante. Instituto de Patologia e Biologia Molecular. Universidade do Porto (IPATIMUP). Porto, Portugal

GILLES LANDMAN

Professor Doutor. Faculdade de Medicina do ABC. Médico Patologista. Departamento de Patologia. Hospital do Câncer. São Paulo, SP

GLAUCE APARECIDA PINTO

Pesquisadora. Laboratório de Patologia Experimental. Centro de Assistência à Saúde da Mulher – CAISM. Universidade Estadual de Campinas, SP

IRENE LORAND-METZE

Professora Titular da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas – FCM. Universidade Estadual de Campinas, SP

JOSÉ VASSALLO

Professor Doutor do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas – FCM. Universidade Estadual de Campinas, SP

JOSÉ CABEÇADAS

Médico Patologista. Consultor de Anatomia Patológica do Instituto Português de Doenças Oncológicas de Lisboa. Assistente convidado de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Nova de Lisboa

LILIANA A. L. DE ANGELO ANDRADE

Professora Doutora do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas – FCM. Universidade Estadual de Campinas, SP

LUIZ C.C. GAYOTTO

Professor Titular. Diretor da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP

LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES

Professor Titular. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná

MARIA IRMA SEIXAS DUARTE

Professora Titular. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP

MARIA TERESA SEIXAS

Professor Adjunto Doutor. Departamento de Patologia. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

MAURA MOSCARDI BACCHI

Professor Doutor. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina. Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, UNESP

RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS

Pesquisador Científico, Divisão de Patologia. Instituto Adolfo Lutz

ROBERTO A. PINTO PAES

Professor Associado-Doutor. Departamento de Patologia. Faculdade de Ciências Médicas. Santa Casa de São Paulo

SUELY NONOGAKI

Pesquisador Científico, Divisão de Patologia. Instituto Adolfo Lutz

VÂNIA NOSÉ

Professor Adjunto-Doutor. Departamento de Patologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES

Professor Associado. Departamento de Patologia. Instituto Adolfo Lutz e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP

VICTOR EDUARDO ARRUA ARIAS

Médico do Instituto Adolfo Lutz

PREFÁCIO

Um dos principais objetivos da Sociedade Brasileira de Patologia é estimular a educação continuada e contribuir para o desenvolvimento de todos os patologistas neste imenso Brasil. Nestes dois últimos anos, realizamos muitas atividades científicas, sempre com resposta entusiasmada de nossos associados. O XXII Congresso Brasileiro de Patologia, em Curitiba, exigiu um grande esforço de organização, mas tenho certeza que irá alcançar todo o sucesso. Lançamos recentemente um programa para incentivo do controle de qualidade, dentro de conceitos modernos e abrangentes, permitindo a patologistas dos quatro cantos de nosso país participarem igualmente. As atividades científicas são tantas que é difícil acompanhar o ritmo.

É indiscutível que a literatura brasileira se ressente de boas publicações de referência. Neste sentido, a S.B.P. realiza um esforço incomensurável para oferecer à sua comunidade um pouco mais. Após a segunda edição do Manual de Padronização de Laudos, temos agora o imenso prazer de lançar o *Manual de Imuno-histoquímica*.

Esta publicação foi praticamente uma exigência dos Patologistas Brasileiros. Em uma época em que o diagnóstico preciso determina o tratamento e o prognóstico das neoplasias, não podemos dispensar o uso da imuno-histoquímica. Uma boa prática da patologia, tanto diagnóstica como investigativa, passa obrigatoriamente pela utilização de marcadores teciduais. É necessário conhecer-se exatamente os limites de sua utilização, suas armadilhas e, principalmente, os seus benefícios. Esta poderosa arma técnica não pode ser dispensada por mais nenhum patologista em atividade.

O presente Manual traz à discussão todos estes pontos. Os 26 autores, distribuídos em 22 capítulos, são todos especialistas em suas áreas e profundos conhecedores do assunto. As informações foram cuidadosamente elaboradas e são resultantes do árduo trabalho diário e extensa pesquisa bibliográfica. Os editores, três expoentes e pioneiros da área, fizeram um irrepreensível exercício intelectual de criticar, reunir e organizar uma edição marcante. O *Manual de Imuno-histoquímica* encontra muitos poucos similares no mundo, pois nele as informações estão agregadas de forma densa e vertical. Os conhecimentos atuais no campo estão apresentados concisamente, ao invés de espalhados por cada entidade nosológica, como nos grandes livros texto.

Nada disso seria possível sem a contribuição e dedicação do pessoal de apoio. A Carmen Sílvia Leite Varoli e Luis Humberto Maviero Arrieta, os mais sinceros agradecimento da S.B.P. pelo trabalho de secretaria e digitação.

Quando deparamos com o Manual pronto, nos apresentou mais um desafio administrativo: o de viabilizar a sua edição, tornando-o acessível ao maior número de patologistas, residentes e alunos de pós-graduação. Os gastos com uma publicação são muito elevados. Não podíamos repassar estes custos aos nossos associados. Neste momento, contamos com nossos parceiros comerciais, que responderam afirmativamente a proposta de financiar parcialmente, sem qualquer sugestão de interferência no conteúdo temático do livro. Embora desnecessário afirmar, a liberdade dos editores jamais foi tolhida pela decisão administrativa de encontrar financiamento para o livro. E o grande privilegiado desta parceira é o nosso associado, que tem a excelência associada a um preço justo.

Assim é a S.B.P. hoje. Apostando alto na qualidade do Patologista Brasileiro, criando condições para o desenvolvimento harmônico da especialidade. Pela criação de obras de referência nacional, decorrente da experiência autóctone, acreditamos no incremento da qualidade de nossos profissionais. Espero que todos apreciem o *Manual de Imuno-histoquímica*, como eu próprio o fiz,

Atenciosamente

Fernando A Soares
Presidente

SUMÁRIO

- 1. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica, 1**
Venâncio A.F. Alves
- 2. Tumores de partes moles**
Maria Teresa de Seixas, Cristiane Gobbo Cançado e Carlos E. Bacchi
- 3. Caracterização de sítios primários de carcinomas metastáticos**
Carlos E. Bacchi
- 4. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário**
Fernando C. Schmitt
- 5. Tumores urológicos**
Fernanda B.C. Cavalcante e Venâncio A.F. Alves
- 6. Pele e Anexos**
Gilles Landman
- 7. Sistema neuro-endócrino – Conceitos e marcadores genéricos**
Vânia Nosé
- 8. Hipófise**
Vânia Nosé
- 9. Tireóide, paratireóide, pâncreas endócrino e adrenal**
Vânia Nosé
- 10. Sistema nervoso**
Luiz Fernando Bleggi Torres
- 11. Hematopatologia – Aspectos gerais**
José Vassallo
- 12. Linfomas não-Hodgkin de células B**
Maura M. Bacchi
- 13. Linfomas não-Hodgkin de células T**
Fernando A. Soares e Victor E. A. Arias
- 14. Linfoma de Hodgkin**
Roberto A. P. Paes e José Cabeçadas
- 15. Medula óssea – Avaliação diagnóstica**
José Vassallo
- 16. Medula Óssea - Imunofenotipagem das leucemias**
Irene Lorand-Metze
- 17. Marcadores de proliferação celular**
Evandro S. de Mello e Venâncio A.F. Alves
- 18. Moléstias Infecciosas**
Maria Irma S. Duarte e Carla Pagliari
- 19. Papilomavírus**
José Vassallo, Glauce A. Pinto e Liliana A. L. De Angelo Andrade
- 20. Fígado**
Venâncio A.F. Alves, Alda Wakamatsu, Raimunda Telma M. Santos, Suely Nonogaki, Cristina T. Kanamura e Luiz C.C. Gayotto
- 21. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização “in situ”**
Raimunda Telma M. Santos, Alda Wakamatsu, Cristina T. Kanamura, Suely Nonogaki e Glauce A. Pinto
- 22. Glossário dos principais marcadores imuno-histoquímicos**
Evandro S. Mello e Venâncio A.F. Alves

1. GARANTIA DE QUALIDADE EM IMUNO-HISTOQUÍMICA

Venâncio A.F. Alves

A aplicação da imuno-histoquímica (IHQ) à rotina diagnóstica já é uma realidade em nosso meio, estimando-se seu uso em mais de 100 laboratórios no Brasil. Sendo assim, agora, a principal meta para o desenvolvimento da IHQ é a busca de instrumentos para avaliar e assegurar a qualidade, visando à otimização dos resultados, e da relação custo-benefício.

Uma vez treinada a equipe de trabalho e montada a estrutura laboratorial, os principais pontos para a garantia de qualidade em IHQ são a correta **indicação de casos** para exame, num adequado contexto clínico-morfológico, a **seleção de anticorpos** para compor o painel diagnóstico, o **protocolo de reações**, devendo cada etapa da reação ser detalhadamente padronizada e a **interpretação** pelo médico patologista^(1,2).

A **indicação** do exame tem por base a seleção de perguntas pertinentes ao contexto clínico-morfológico, sabendo-se de antemão as vantagens e os limites da imuno-histoquímica em cada situação^(3,4,5,6,7,8). De modo genérico, podemos considerar como principais indicações para o exame imuno-histoquímico:

1. Diagnóstico histogenético de neoplasias morfolologicamente indiferenciadas

A persistência de antígenos de determinada linhagem celular, mesmo sem evidências morfológicas de diferenciação, tem se mostrado de grande impacto na seleção de terapêutica, aumentando a eficiência de esquemas radio ou quimioterápicos, agora melhor dirigidos à linhagem das células neoplásicas.

2. Subtipagem de neoplasias

Exemplos desta aplicação são os linfomas, que, na classificação mais atual^(20,21) têm a seleção terapêutica direcionada pela integração dos parâmetros clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos, como será apresentado nos Capítulos 11 a 16.

3. Caracterização da origem de carcinomas

Ainda que nem sempre permitindo o diagnóstico definitivo, a aplicação de painéis imuno-histoquímicos em amostras de carcinomas metastáticos para a seleção dos mais prováveis sítios de neoplasia original tem implicado em melhor seleção dos métodos de imagem, com considerável redução dos custos e do tempo de início do tratamento. Este é o tema de detalhada discussão no Capítulo 3.

4. Caracterização de produtos de secreção de células neoplásicas

A demonstração de substâncias, como os hormônios, produzidas pela neoplasia, permite detalhada correlação com manifestações clínicas, especialmente aquelas conhecidas como "paraneoplásicas", conforme apresentado nos Capítulos 7 a 9.

5. Discriminação de natureza "Benigna" versus "Maligna" de determinadas proliferações celulares

Em situações especiais, o encontro de determinadas moléculas caracteriza um comportamento biológico não identificável em bases puramente morfológicas. Exemplos desta situação são a presença de células basais (positivas para CK14) em proliferações prostáticas benignas⁽²²⁾ ou ainda a positividade imuno-histoquímica para p53, própria da "displasia" de vários epitélios, como o de cólon ou o do esôfago de Barrett⁽²³⁾. Uma discussão do problema "proliferação benigna x maligna" nos tecidos linfóides pode ser encontrada no Capítulo 11.

6. Avaliação prognóstica de neoplasias

Tendo como protótipo o carcinoma mamário (Capítulo 4), diversas neoplasias têm sua avaliação prognóstica complementada de modo importante pela detecção de receptores hormonais, de oncoproteínas e de fatores ligados à angiogênese e ao ciclo celular, sendo estes últimos tema do Capítulo 17.

7. Identificação de agentes infecciosos

Várias infecções têm reconhecimento de seu agente causal, nem sempre identificável à morfologia, pela detecção imuno-histoquímica de seus antígenos, aspecto de grande importância em infecções em imunossuprimidos. Algumas infecções, como as hepatites por vírus, têm, neste tipo de estudo, um de seus melhores controles de eficácia de agentes anti-virais. Estes assuntos serão estudados nos Capítulos 18 a 20.

Em levantamento de 200 amostras que recebemos em consulta, a busca de histogênese foi a motivação para o estudo IHQ em 32% dos casos, sendo a subclassificação e a busca de órgãos de origem de neoplasias metastáticas responsável por 16%. O estudo dos produtos de síntese de células neoplásicas motivou a realização do exame em 5%, a diferenciação entre a natureza "benigna" ou "maligna" de proliferações em 7% e a caracterização de um perfil de marcadores prognósticos respondeu por 28%. A pesquisa de antígenos de agentes infecciosos foi a razão para indicação da IHQ em 12% dos casos.

No intuito de avaliar a questão da indicação dos exames imuno-histoquímicos em nossas condições práticas de trabalho, permitindo uma estimativa de seu custo num contexto global em patologia cirúrgica atual, fizemos recentemente um estudo de todas as neoplasias malignas submetidas a exame anatomopatológico em um hospital geral, durante dois anos, discutindo as principais razões para a solicitação do estudo imuno-histoquímico⁽²⁴⁾.

Dentre 8095 casos sequenciais, referentes aos anos de 1994 e 1995, solicitados pelo corpo clínico do Hospital Alemão Oswaldo Cruz a seu laboratório, 1205 (14,69%), constituíam neoplasias malignas. Dentre estas, 355 (4,2% do total de casos ou 28,55% das neoplasias malignas), tiveram indicação e foram submetidas a estudo imuno-histoquímico com finalidade de avaliação diagnóstica ou prognóstica.

Os 4,2% de indicações no total de casos mostram que, com o uso judicioso da imuno-histoquímica, o custo adicional no conjunto da atividade laboratorial é muito baixo, quando confrontado com o ganho de tempo até o diagnóstico definitivo, a

economia com outros métodos diagnósticos muito mais onerosos e, em especial, a elevada precisão diagnóstica, permitindo terapêutica mais eficaz. Em uma "auditoria" realizada em 7 hospitais gerais na Itália, Andrion e colaboradores, 1996, constataram que a imuno-histoquímica foi indicada em uma faixa que variou de 2,7 a 8 % dos casos, sendo 4,6 % a média de indicações dos sete laboratórios ⁽²⁵⁾.

Sua indicação, em nosso levantamento, em 28,5% das neoplasias malignas é similar aos 30,5% da recente série de Rosai ⁽²⁶⁾, sendo tal índice consideravelmente inferior aos 47,5% dos tumores estudados por Leong & Wright ⁽⁴⁾, autores que também demonstraram a grande utilidade da aplicação prática da IHQ por centros capacitados e experientes.

A Tabela 1 demonstra a freqüência de indicações para IHQ conforme as classes de tumores analisadas.

Tabela 1 - Distribuição das principais classes diagnósticas de neoplasias malignas conforme a indicação de exame imuno-histoquímico			
	Sim (%)	Não	Total
Carcinomas	209 (22,28 %)	729	938
Sarcomas	34 (47,89 %)	37	71
Tumores neurais	13 (26 %)	37	50
Melanomas	06 (15,78%)	32	38
Processos linfoproliferativos	64(80%)	16	80
Tumores linhagem germinativa	04 (28,57%)	10	14
Neoplasias malignas indif.	14 (100%)	0	14
Total	344 (28,55%)	861 (71,45%)	1205

A **seleção de painéis de anticorpos** é um dos aspectos mais importantes para a melhor aplicabilidade da IHQ no diagnóstico. Alguns autores mostram preferência por "conjuntos de anticorpos dirigidos a conjuntos de diagnósticos diferenciais morfológicos" (tool boxes) ⁽²⁶⁾, e, após o primeiro turno de reações, selecionam uma reação complementar com anticorpos individualizados. Outros, como nós, preferem selecionar um painel de anticorpos para cada caso ^(3,38). Em ambas as situações, é sempre importante repetir a necessidade de inserir a abordagem imuno-histoquímica no contexto clínico-morfológico de cada caso. Em recente estudo de controle de qualidade em laboratórios dinamarqueses, Jensen e colaboradores, 1997 concluíram que "a seleção do painel de anticorpos e a interpretação dos padrões de reação de cada caso foram os fatores mais importantes para o resultado diagnóstico final" ⁽²⁷⁾. Na Inglaterra, Prescott e colaboradores, 1995, atribuíram à má seleção de anticorpos 42,1% das discrepâncias diagnósticas em IHQ ⁽²⁸⁾.

A **obtenção, manuseio e envio do espécime** são fatores críticos. Aspectos relacionados à fixação e à recuperação de antígenos serão detalhados nos capítulos que se seguem. Sendo a fixação em formol e a inclusão em parafina o processamento histológico mais usado internacionalmente, concordamos com Wick ⁽⁶⁾ e Swanson et al. ⁽⁸⁾ que propõem que seja este o procedimento-padrão para comparação de desempenho diagnóstico das reações imuno-histoquímicas.

A quantidade de material a analisar tem sido discutida, especialmente neste tempo em que se espera que o patologista ofereça diagnóstico cada vez mais preciso em amostras cada vez menores. De modo genérico, concordamos com Balaton e colaboradores, 1996, que consideram que, na maioria das situações, um bloco é suficiente, preferencialmente contendo um fragmento de interface tumor-parênquima circunvizinho, ou já preparado quando do exame macroscópico com um fragmento do tumor, longe de área hemorrágica ou extensamente necrótica, e outro representativo do parênquima distante da neoplasia ⁽²⁹⁾. Sempre que possível, deve ser evitado o uso do próprio tecido previamente submetido a exame de congelação.

A **seleção de metodologia mais adequada** é uma das grandes responsabilidades do Laboratório de Imuno-histoquímica. O extraordinário avanço da Imuno-histoquímica, especialmente na última década, com os sistemas de "recuperação de epítomos através do calor" (HIER) e métodos de amplificação poderosos, como o EPOS ⁽³⁰⁾ e o método de deposição de produto de catalisação (CARD) de Bobrow e colaboradores ⁽³¹⁾, adicionou um paradoxo à Imuno-histoquímica. De um lado, numerosos casos até então "insolúveis" pela negatividade para os vários painéis, tornaram-se marcáveis por anticorpos que passaram a permitir o diagnóstico preciso. De outra parte, anticorpos que marcavam caracteristicamente determinadas neoplasias passaram a reagir "inespecificamente" em outras situações, como a actina muscular e as citoqueratinas ⁽³²⁾. Preocupado com o que denominou "a anarquia" então introduzida, Swanson ⁽³²⁾ propôs, recentemente, que nenhum método deva ser universalmente aplicável, devendo a escolha recair sobre a técnica que, na experiência do próprio laboratório, ou da escola seguida por seus patologistas, melhor tiver respondido à questão diagnóstica específica. Concordamos plenamente com esse mestre da Imuno-histoquímica, em que o mesmo princípio se aplica aos estudos de interesse acadêmico, quando a aplicação cega de uma nova técnica não deve substituir outra já bem padronizada apenas por ter sido desenvolvida mais recentemente ou com maior alarde por um determinado pesquisador.

Visando à simplificação dos procedimentos, redução de custos e riscos de erros técnicos, para a rotina diagnóstica, sugerimos a recuperação antigênica por irradiação com microondas ou pelo calor úmido em panela de pressão, com tempos de exposição adaptados para oferecer o mesmo padrão de marcação em um conjunto de casos-controle ^(9,10). Consideramos, também, útil na redução de erros, o uso de anticorpo secundário multivalente ⁽¹¹⁾. Dentre os sistemas de amplificação de alto desempenho (avidina-biotina-peroxidase, estreptavidina-biotina-peroxidase ou avidina-marcada (LSAB), temos usado rotineiramente o sistema streptavidina-biotina-peroxidase ⁽¹²⁾. Situações específicas requerem adaptações.

A Comissão de Controle de Qualidade em Imuno-histoquímica da Sociedade Francesa de Patologia publicou, em 1997, relatório demonstrando que duas das principais causas de erro diagnóstico em Imuno-histoquímica são a não utilização de técnicas de recuperação antigênica e o uso de métodos de amplificação pouco

potentes, em particular aqueles com anticorpos secundários diretamente ligados à enzima ⁽³³⁾.

A execução dos procedimentos diretamente relacionados à reação requer conhecimento, experiência e atenção continuada de toda a equipe. Em recente Editorial, Erlandson e Rosai ⁽⁷⁾ recomendam que "todas as amostras que requeiram exames especiais, como a Imuno-histoquímica, sejam avaliados a laboratórios bem estabelecidos e equipados e, especialmente, contando com pessoal técnico altamente qualificado".

O conhecimento das características de cada reagente, especialmente dos anticorpos, requer nova titulação em cada novo lote, selecionando-se a diluição que ofereça o maior contraste "positividade verdadeira/fundo". É necessária a anotação de cada procedimento no Livro Protocolo, como parte de um programa abrangente de garantia de qualidade. Tal aspecto pode parecer repetitivo, mas, para cada erro ou problema detectado a tempo poderá ser buscada uma solução mais coerente, muitas vezes ainda no curso das etapas seguintes da própria reação. Estas anotações permitem, agora, a implantação dos procedimentos práticos dos Programas de Garantia de Qualidade Inter-laboratorial que as Sociedades Brasileira de Patologia (SBP) e de Citopatologia (SBC) estão implantando em nosso país.

A qualificação da equipe, através de cursos e treinamentos iniciais e em reciclagem é fundamental, inclusive pela necessidade de contínuo aprendizado das inovações técnicas, uma característica marcante desta subespecialidade, ressaltando-se, em nosso meio, os esforços associativos, de âmbito nacional ou regional, que muito têm contribuído para a contínua elevação dos padrões de qualidade.

Reagentes

Enquanto as substâncias químicas dos tampões e substratos já têm sua produção plenamente regulamentada, ainda há polêmicas quanto aos anticorpos poli ou monoclonais, cruciais para a identificação específica dos antígenos característicos de cada entidade nosológica. A origem de cada anticorpo, o(s) real(is) sítio(s) antigênico(s) por ele reconhecido e seu desempenho em diversas condições laboratoriais, são fatores cuja padronização acarreta num dilema: a falta de regulamentação pode permitir o uso de reagentes de eficácia não comprovada, enquanto seu excesso pode inviabilizar o uso de numerosos reagentes já consagrados na prática diagnóstica ⁽³⁴⁾.

Tal polêmica foi, em parte, resolvida nos EUA, onde o órgão regulador, FDA, após grande polêmica, isentou-os de muitos pré-requisitos no registro pré-comercialização, viabilizando, inclusive, o uso de anticorpos "home-made", desde que comprovada por relatórios técnico-científicos sua afinidade específica para o antígeno proposto ^(34,35). Fica, desta forma, reconhecido o fato de serem os anticorpos, ainda que essenciais, apenas um dos componentes para a aplicação diagnóstica da imuno-histoquímica, cuja segurança e eficiência depende também dos protocolos de reação e, em especial, da condição clínico-morfológica específica daquela aplicação. A aplicação final recai, portanto, no médico patologista, que conduz o caso em sua integralidade.

Interpretação das lâminas

A validação dos achados requer a verificação dos padrões de reatividade dos controles positivos e negativos, internos e externos, que também deve ser anotada no Livro Protocolo. Os controles externos devem ser incluídos em cada painel, preparados a partir de amostras fixadas nas mesmas condições dos casos em teste, e não em condições superiores, que poderiam implicar em falsa segurança da validade da reação. É, ainda, necessária a atenção à reatividade de estruturas presentes na própria lâmina do caso em estudo que possam servir como controles positivos internos, como por exemplo a reatividade dos vasos para vimentina, marcadores musculares e endoteliais ou ductos mamários adjacentes a neoplasias para receptores de estrógeno e de progesterona. De modo análogo, estruturas sabidamente negativas para um marcador oferecem excelente controle negativo interno, já que foram submetidas ao mesmo tratamento que o tecido-teste ^(15,16,17,18).

A responsabilidade indelegável do patologista quanto à interpretação reside especialmente em identificar quais células exibem reatividade para o antígeno, as alterações morfológicas nas células reativas, bem como a distribuição intra-celular do antígeno, em comparação com os padrões já relatados na literatura para cada molécula ^(27,36).

Jensen e colaboradores, 1997 ⁽²⁷⁾, e Rickert e Malanick ⁽³⁶⁾ consideram a interpretação, juntamente com a seleção dos painéis de anticorpos, os fatores mais críticos referentes à qualidade diagnóstica em imuno-histoquímica, sendo fundamental o domínio dos perfis de reatividade antigênica mais comuns de cada tipo de neoplasia, bem como das "expressões anômalas" (exceções) mais conhecidas. Ressaltam, ainda, Jensen e colaboradores, 97 ⁽²⁷⁾, a importância de se valorizar mais as positivities que as negatividades para um diagnóstico individual.

Em trabalho de "auditoria técnica de desempenho de um laboratório de patologia cirúrgica de um hospital geral na Inglaterra", Prescott e colaboradores, 1995 relataram que a interpretação errônea de lâminas foi responsável por 15,8% das discrepâncias diagnósticas em imuno-histoquímica ⁽²⁸⁾.

Mesmo que a vasta maioria dos exames imuno-histoquímicos não requeira urgência absoluta, é claro que o **tempo** entre a recepção da amostra e o retorno do laudo ao requisitante é um fator crucial para a credibilidade do método. Nossa avaliação é que este tempo deva ser sempre inferior a uma semana, aceitando-se exceções, especialmente quando os painéis iniciais não permitirem a elucidação do caso. No caso de infecções em imunossuprimidos, entretanto, muitas vezes a análise requer urgência, já que infecções por agentes como *P. carinii* e citomegalovírus podem ocasionar o óbito muito rapidamente.

O LAUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Seguindo várias idéias de Peter Banks ⁽¹⁹⁾, apresentamos agora algumas sugestões para o preparo de um **Laudo Padronizado em Imuno-histoquímica**:

- Logo após a identificação completa do paciente, incluindo dados do laudo morfológico original, deve ser apresentado o problema diagnóstico que motivou o exame.

- A natureza do espécime recebido, bloco, lâminas, adesivos e, especialmente, tipo e tempo de fixação devem ser explicitados.
- Breve descrição dos procedimentos deve incluir os métodos de recuperação antigênica usados, bem como os sistemas de amplificação e os controles.
- Devido à crescente variedade de reagentes disponíveis, é fundamental a apresentação dos clones empregados, principalmente em famílias moleculares maiores, como por exemplo as citoqueratinas.
- A conclusão deverá ser a mais completa possível, procurando, como já assinalado, máxima integração com os aspectos clínicos e morfológicos.
- Após a emissão do laudo, a **comunicação com o requisitante** precisa ser contínua, gerando realmente uma parceria entre os colegas, visando ao melhor resultado em termos de diagnóstico e de avaliação prognóstica.
- Os **arquivos** de laudos, requisições, blocos, lâminas (incluindo controles de cada reação), bem como do livro de protocolo de reações são de grande importância, quer para dirimir dúvidas que possam surgir posteriormente, quer para análises custo-benefício ou levantamentos de interesse científico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bachner P. Quality Assurance: An accreditation perspective. *Laboratory Medicine* 1989; 20:159-162.
2. Howanitz PZ. Quality assurance measurements in Departments of Pathology and Laboratory Medicine. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990; 114:1131-1135.
3. Battifora H. Immunohistochemistry in tumor diagnosis: Uses, abuses and pitfalls. *International Academy of Pathology Meeting, Buenos Aires* 1990; 17.
4. Leong ASY, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. *Histopathology* 1987; 11:1295-1305.
5. Schmitt FC, Kimaid PA, Campos PF, Bacchi CE. Utilidade dos métodos imuno-histoquímicos para o diagnóstico anátomo-patológico. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S.Paulo* 1991; 46:26-30.
6. Wick MR. Algorithmic immunohistologic analysis of undifferentiated neoplasms. *Arthur Purdy Stout Society of Surgical Pathologists Companion Meeting, Hand-out* 1995; 9-15. *U.S. & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting.*
7. Erlandson RA, Rosai J. A realistic approach to the use of electron microscopy and other ancillary diagnostic techniques in surgical pathology (Editorial). *Am. J. Surg. Pathol.* 1995; 19:247-250.
8. Swanson PE, Dehner LP, Sirgi KE, Wick MR. Cytokeratin immunoreactivity in malignant tumors of bone and soft tissue. A reappraisal of cytokeratin as a reliable marker in diagnostic immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2: 103-112.
9. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1991; 39: 741-748.
10. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 1992; 168: 357-363.
11. Leong A. *Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist.* London, Edward Arnold Publishers 1993; 427.
12. Elias JM, Gaborc D. A comparison of the peroxidase-anti-peroxidase (PAP), avidin-biotin complex (ABC) and labeled avidin-biotin (LAB) methods for detection of glucagon in paraffin embedded human pancreas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989; 92:62.
13. Naritoku WY, Taylor CR. A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: An evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. *J. Histochem. Cytochem* 1982; 30:253.
14. Cordell JL, Fallini B, Erber WN. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complexes. *J. Histochem. Cytochem.* 1984; 32:219.
15. Elias JM. *Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis.* ASCP Press, Chicago, 1990.
16. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H. Special report: Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989; 92:836-843.
17. Taylor CR, Cote RJ. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist.* 2nd Ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia 1994.
18. Taylor CR. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem* 1993; 1 :232-243.
19. Banks PM. Incorporation of immunostaining data in anatomic pathology reports. *Am. J. Surg. Pathol.* 1992; 16:808-810.
20. Harris NJ, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, DeWolf Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri AS, Piris

- MA, Ralfkiaer E, Warnke RA. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1997; 84: 1361-1368.
21. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3909-3918.
 22. Shah IA, Shlaageter M, Stinnett P, et al. Cytokeratin immunohistochemistry as a diagnostic tool for distinguishing malignant from benign epithelial lesions of the prostate. *Mod. Pathol.* 1991; 4: 220 – 224.
 23. Younes M, Lebovitz RM, Lechago L, Lechago J. p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterology* 1993; 105: 1637-1642.
 24. Alves VAF, Torres LN. A imuno-histoquímica no diagnóstico em oncopatologia - Quanto e quando indicar. *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Patologia* 1997; Brasília, DF.
 25. Andrión A, Feyles E, Lange A, Giudici M, Grasso G, Amore M, Bondi A, Cristofori E, Pezzotta MG, Bellomi A, Anghinoni E, Barbazza R, Magnani C, Ciccone G. Audit dell'attività istopatologica nei servizi di sette ospedali generali. 1. Tipi di risorse e aspetti quantitativi delle prestazioni. *Pathologica* 1996; 88: 18-24.
 26. Rosai J. Editorial: A consultant's apologia of immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2: 229-230.
 27. Jensen ML, Nielsen O, Johansen P, Clausen PP. Immunohistochemistry in tumor diagnosis. External quality assessment of 13 Departments of Pathology in Western Denmark. *Appl. Immunohistochem.* 1997; 5:35-44.
 28. Prescott RJ, Wells S, Bisset DL, Banerjee SS, Harris M. Audit of tumour histopathology reviewed by a regional oncology centre. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 245-249.
 29. Balaton AJ, Coindre JM, Collin F, Ettore F, Fiche M, Jacquemier J, Le Doussal V, Mandard AM, Mathieu MC, Migeon C, Simony-Lafontaine J, Treilleux I, Verrielle V, Vilain MO, Zafrani B. Recommandations pour l'évaluation immunohistochimique des récepteurs hormonaux sur coupes en paraffine dans les carcinomes mammaires. *Ann.Pathol.* 1996; 16: 144-148.
 30. Pastore JN, Clampett C, Miller J, Porter K, Miller D. A rapid immunoenzyme immunolabeling technique using EPOS reagents. *J. Histotech* 1995; 18 : 35-40.
 31. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods* 1989; 125: 279-285.
 32. Swanson PE. HIERanarchy: The State of the Art in Immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 137: 139-140.
 33. Commission Immunohistochimie de L'Association Française D'Assurance de Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques (AFAQAP-IHC): Évaluation externe de la qualité technique en immunohistochimie. *Ann.Pathol.* 1997; 17:129-133.
 34. Taylor CR. To approve or not to approve? That is the question. Ethical Concerns over the regulation of Immunohistochemical stains. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1994; 118: 1086-1092.
 35. Garrett CT. FDA Regulation of analyte-specific reagents (ASRs). Implications for Nucleic Acid-based Molecular Testing.: *Diagn.Mol.Pathol.* 1996; 5: 151-153.
 36. Rickert RR, Maliniak RM. Intralaboratory quality assurance of immunohistochemical procedures: recommended practices for daily application. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989; 113: 673-679.
 37. Bacchi CE, Gown A, Bacchi MM, Alves VAF. Curso de Imuno-histoquímica ("Hand-out"), Congresso Brasileiro de Patologia, 1997; 57.
 38. Alves VAF, Gayotto LCC. A imuno-histoquímica no contexto atual do diagnóstico anatomopatológico. Manual de Imuno-histoquímica (com menções à técnica de hibridização molecular), Sociedade Brasileira de Patologia, 1995.

2. TUMORES DE PARTES MOLES

Maria Teresa de Seixas, Cristiane Gobbo Caçado e Carlos E. Bacchi

Sarcomas de partes moles são um grupo de doenças que com frequência apresentam dificuldades diagnósticas ao patologista. Em aproximadamente 25-30% dos sarcomas, dependendo da experiência do patologista, não se consegue obter diagnóstico preciso da histogênese, utilizando-se somente a microscopia óptica. Isso ocorre pois sarcomas, e mesmo outros tipos de tumores, podem apresentar quadro morfológico superponível. Felizmente o número crescente de marcadores tumorais aplicáveis a tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, tem permitido maior precisão diagnóstica entre os sarcomas. Nesse capítulo, apresentamos os tumores de partes moles mais freqüentes e aqueles que apresentam dificuldade diagnóstica, juntamente com a descrição dos seus marcadores.

RABDOMIOSSARCOMA

O Rabdomyossarcoma, neoplasia cuja única linha de diferenciação celular é a de rabdomioblastos⁽¹⁾, constitui-se no sarcoma de partes moles mais freqüente no grupo pediátrico. Com relação ao diagnóstico é necessário demonstrar de maneira inequívoca a presença do rabdomioblasto neoplásico. Cumpre lembrar que o tumor recapitula a miogênese fetal, daí a diversidade de aspectos histológicos variando desde neoplasias extremamente primitivas, embrionárias, até tumores bem diferenciados. A presença de estriações transversais não é necessária para o diagnóstico, uma vez que nem sempre ela é visível a microscopia óptica convencional. Estima-se que tal achado inconstante se encontra presente em menos de 50% dos rabdomyossarcomas. Estes tumores consistentemente expressam vimentina, filamento intermediário de 57Kd, presente no cito-esqueleto da maioria das células mesenquimais.

Anticorpos contra uma variedade de antígenos musculares são úteis no diagnóstico dos rabdomyossarcomas^(2,3).

A mioglobina, hemoproteína carreadora de oxigênio, é um dos marcadores mais antigos de rabdomyossarcomas. Tsokos et al (1983)⁽⁴⁾ testando a mioglobina em rabdomyossarcomas demonstrou sua utilidade porém baixa sensibilidade nos tumores primitivos. Parece haver uma correspondência entre o grau de diferenciação e a imunexpressão, sendo os rabdomioblastos mais diferenciados positivos enquanto os indiferenciados tendem a ser negativos^(5,6,7,8). Mesmo nesses casos, as células positivas costumam revelar achados citológicos evidentes de rabdomioblastos.

A desmina, filamento intermediário de 53Kd, associada à banda Z, encontra-se presente em todas as células musculares estriadas e na maioria das células musculares lisas. Truong et al (1990) estudaram através do método imuno-histoquímico a expressão de desmina em 584 amostras de tecidos normais e neoplásicos e concluíram ser este um marcador sensível e específico para determinar diferenciação muscular⁽⁹⁾. Kodet relatou em rabdomyossarcomas uma positividade de 87%⁽¹⁰⁾. Dodd et al 1989 ressaltaram a utilização da desmina como critério diagnóstico nesses tumores⁽¹¹⁾. A variação de positividade provavelmente reflete as diferenças no grau de diferenciação do tumor, no critério diagnóstico utilizado para seleção dos casos, na afinidade tecidual do anticorpo, nos fixadores utilizados, além da utilização ou não de métodos de recuperação de

epítomos. Citamos por exemplo o trabalho de Molenaar et al 1985 que estudando rabdomyosarcomas com desmina em uma época pré recuperação antigênica por calor encontrou grande número de casos negativos para este anticorpo ⁽¹²⁾. Com o advento da recuperação antigênica pelo calor (HIER- Heat Induced Epitope Retrieval) a sensibilidade da desmina em detectar tais neoplasias têm sido alta.

A expressão de desmina, é encontrada na vasta maioria dos rabdomyosarcomas. A desmina não é marcador específico para músculo esquelético, sendo também expressa em células musculares lisas, normais e neoplásicas , nos tumores que apresentam diferenciação miofibroblástica. A desmina tem sido encontrada também em tumores com diferenciação divergente ⁽¹³⁾.

As actinas são microfilamentos compostos por sequências de aminoácidos, que podem ser separados por eletroforese em 06 isoformas, com peso molecular de 42 Kd e são agrupadas em 03 subunidades: alfa (muscular), beta (não muscular) e gama (células musculares e não musculares). Como a desmina, as actinas estão associadas à banda Z. Existem 03 isoformas de actina alfa (esquelética, cardíaca e de músculo liso). Tsukada et al 1987 desenvolveram o clone HHF-35 ⁽¹⁴⁾, anticorpo monoclonal pan-actina com alta sensibilidade em material fixado em formol e incluído em parafina. Esse anticorpo HHF-35 reage com as actinas alfa e gama, reconhecendo células musculares lisas e estriadas ⁽¹⁵⁾. O antígeno detectado é resistente à fixação prolongada. Resultados falso-positivos podem ser obtidos quando o anticorpo não é previamente pré-diluído em EDTA ⁽¹⁶⁾.

Carter e Hall (1992) analisaram 52 rabdomyosarcomas e concluíram ser a actina sarcomérica útil na identificação das formas primitivas da neoplasia ⁽¹⁷⁾. Hasegawa et al (1998) encontraram 100% de positividade em 06 casos de rabdomyosarcomas analisados ⁽¹⁸⁾.

O HHF35 é comumente utilizado no diagnóstico dos rabdomyosarcomas. Em estudo de Schmidt et al (1988) incluindo 30 rabdomyosarcomas, todos os 9 bem diferenciados e 20 (95%) dos moderadamente e pouco diferenciados reagiram com este marcador ⁽¹⁹⁾. Esse resultado demonstra a alta sensibilidade do HHF35 no diagnóstico dos rabdomyosarcomas.

Recentemente um grupo de genes denominados Myo D1 (gene 1 da determinação da miogênese) foram isolados, identificados e mostraram-se capazes de induzir diferenciação muscular ⁽²⁰⁾. O gene presente no braço curto do cromossomo 11 codifica uma fosfoproteína nuclear de 45Kd. O MyoD é expresso em um estágio precoce de diferenciação muscular estriada, antes mesmo da expressão de outras proteínas miógenas, tais como a desmina. Scrable et al (1989) demonstraram a expressão deste gene em todos os RMS avaliados ⁽²¹⁾. Dias et al (1990) desenvolveram um anticorpo policlonal anti-MyoD ⁽²²⁾. Posteriormente o mesmo autor desenvolveu anticorpo monoclonal para material congelado. Em material embebido em parafina, Tsokos et al (1994) salientam a utilidade da recuperação de epítomos para a imunolocalização dos antígenos relacionados ao MyoD1 ⁽²³⁾. Parham (1996) e Tallini et al (1994) ressaltam a utilização do anticorpo anti- MyoD no diagnóstico desta neoplasia. Wesche et al (1995) estudaram a imuno-expressão de MyoD1 em sarcomas pleomórficos de adultos ⁽²⁶⁾. Rubin et al ⁽²⁷⁾ encontraram positividade para o Myo D1 e outros marcadores de diferenciação muscular em 02 casos de rabdomyosarcomas de células fusiformes de pacientes adultos, salientando a utilidade da imuno-histoquímica no diagnóstico diferencial de tumores fusiformes.

Outra proteína reguladora da diferenciação miógena é a miogenina, parece ser específica de músculo estriado, estando presente nas fases iniciais de diferenciação miógena. Hasegawa et al (1998) estudando 06 casos de rabdomyosarcomas em pacientes portadores de retinoblastoma bilateral encontraram 100% de positividade imuno-histoquímica para vimentina, miogenina, desmina, HHF35 e actina sarcomérica e positividade para mioglobina em apenas 50% ⁽¹⁸⁾. Wang et al publicou estudo analisando a imuno-expressão da miogenina em tumores pediátricos com boa sensibilidade e especificidade detectar rabdomyosarcomas ⁽²⁸⁾.

LEIOMIOSSARCOMA

Os leiomyosarcomas, acometem preferencialmente indivíduos adultos. Localizam-se comumente em retroperitônio, cavidade abdominal, vísceras, pele e subcutâneo (chamados de superficiais) ou encontram-se relacionados a grandes vasos, tais como veia cava inferior, artéria pulmonar, etc. Microscopicamente apresentam-se como sarcomas fusocelulares, com ou sem áreas mixóides e componente epitelióide, por vezes o elemento predominante em alguns tumores. Demonstram imunorreatividade para marcadores musculares, tais como desmina, actina muscular humana e actina anti-músculo liso ^(9,29, 30,31,32). A positividade para a desmina é frequente nestes tumores e parece estar relacionada ao sítio de origem, sendo menor nos tumores gastrointestinais. Skalli et al (1986) descreveram um anticorpo específico contra alfa actina muscular humana útil na subclassificação dos tumores musculares ⁽³³⁾. A actina anti músculo liso, clone 1 A 4 demonstra alta sensibilidade nestes tumores. Algumas neoplasias de aspecto epitelióide podem imuno-expressar citoqueratinas Rizeq et al (1994) encontrou alta expressão de citoqueratinas em tumores epitelióides, com maior positividade para a anti-citoqueratina AE1 do que para o Cam5.2. Salientam a importância da expressão concomitante de marcadores musculares tais como desmina, actina músculo-específica e actina anti-músculo liso no diagnóstico diferencial com neoplasias epiteliais ⁽³⁴⁾. Schurch et al (1996) analisando uma série de tumores pleomórficos, encontraram 14 leiomyosarcomas, sendo todos os casos positivos para vimentina, 7 para desmina, 8 para actina anti-músculo liso e nenhum deles positivo para actina sarcomérica ⁽³⁶⁾. Outras lesões com diferenciação miofibroblástica, tais como a fasciíte nodular podem imuno-expressar actina músculo específica (HHF35) e actina anti músculo liso. O reconhecimento disto é de extrema utilidade pois a presença de componente miofibroblástico não deve levar a um diagnóstico errôneo. Rizek et al (1994) referem 36% de positividade para o CD34 nos tumores fusiformes e apenas 6% de positividade nas neoplasias epitelióides ⁽³⁴⁾. Leong et al (1997) referem que os leiomyosarcomas expressam colágeno IV ao redor de células individuais ⁽³⁵⁾.

Estudos recentes têm sugerido que o vírus do Epstein-Barr (EBV) está associado a leiomyosarcomas em crianças e adolescentes com AIDS, mas não está relacionado aos casos em indivíduos soro-negativos ⁽³⁶⁾.

TUMOR NEUROECTODÉRMICO PRIMITIVO (PNET) E SARCOMA DE EWING

O primeiro relato de neuroepitelioma periférico foi de Stout em 1918 tratava-se de um tumor de nervo ulnar em paciente masculino de 42 anos. Em 1942 Murray e Stout descreveram um caso similar no nervo radial de um homem de 35 anos. Um dos primeiros relatos de PNET em criança foi de Nesbitt e Viddone quase 60 anos após o relato de Stout. Em 1975 Angervall e Enzinger descreveram um caso de tumor de partes moles similar ao S de Ewing ósseo que foi descrito pela primeira vez na literatura por

James Ewing em 1921. Em 1979 Askin relatou 20 casos de "um tumor maligno da região tóraco-pulmonar de crianças e adolescentes" ficando o tumor conhecido pelo epônimo de Tumor de Askin ^(37,38). Linnoila et al (1986) demonstraram a evidência de diferenciação neural e PAS positividade ⁽³⁹⁾. Dehner cristalizou os conceitos desta neoplasia e os novos casos descritos na literatura tornaram este um tumor não infrequente no grupo pediátrico ^(40,41,42).

O sarcoma de Ewing e o PNET apresentam semelhanças clínicas e morfológicas, além de uma aberração citogenética específica, que é a translocação recíproca do braço longo do cromossomo 11 e 22, t ^(11,22)(q24,q12) encontrada em aproximadamente 85 a 90% dos casos ⁽⁴⁰⁾. Estes achados, juntamente com a expressão do gene MIC2, reforçam as evidências de que o sarcoma de Ewing e o PNET são espectros de uma mesma doença ^(40,43).

O MIC2 é um gene pseudoautosômico localizado no cromossomo X e Y, cuja expressão independe do sexo. Mapeado na região terminal do braço curto do cromossomo X (Xp22.32-pter) e na região eucromatínica do cromossomo Y (Yq11-pter.) o gene codifica uma glicoproteína transmembrana de peso molecular 30000 –32000 daltons (p30/32 -CD99 produto do gene Myc2) cuja função é desconhecida. Papel na adesão e ação mediadora na proliferação celular (via IGF1 por exemplo) foram hipóteses levantadas ⁽⁴⁴⁾.

Um número de anticorpos monoclonais (mAbs) contra o CD 99 foram desenvolvidos e testados nesta neoplasia com alta sensibilidade. Destacamos os clones 12E7⁽⁴⁾, O13(8) e HBA71 ^(43,44,45), que podem ser utilizados em parafina, estando os dois primeiros disponíveis comercialmente.

O estudo imuno-histoquímico no diagnóstico do sarcoma de Ewing /PNET é realizado também para se excluir outros tumores de pequenas células. Por exemplo, a positividade para CD45 permite a diferenciação com linfoma e os neuroblastomas em geral são negativos para o CD99 ^(43,46,47,48). Embora não haja marcador específico para o sarcoma de Ewing /PNET, a forte positividade para CD99 favorece este diagnóstico ⁽⁴⁹⁾. A imunorreatividade em padrão membrana para CD99 nos Sarcomas de Ewin/PNET é vista em aproximadamente 90% dos casos. O CD99 pode ser positivo em alguns outros tumores, incluindo linfoma linfoblástico, em consequência seu uso deve ser sempre utilizado em conjunto com um painel de anticorpos ⁽⁵⁰⁾. Salientamos também a positividade em células da granulosa e de Sertoli e seus tumores, Tumor neuroendócrino de ilhota pancreática, componente tubular do T de Wilms, etc. ^(51,47)

SARCOMA ALVEOLAR DE PARTES MOLES

Desde sua descrição em 1952 por Christopherson ⁽⁵²⁾, a histogênese do sarcoma de partes moles tem sido controversa e permanece desconhecida. Trata-se de tumor raro, que tem sido relacionado a uma série de neoplasias, principalmente neural e muscular. Em crianças tende a ocorrer na região da cabeça e pescoço ⁽⁵³⁾ e em adultos na extremidade inferior. Evidências de diferenciação muscular esquelética têm sido baseadas na demonstração imuno-histoquímica de alguns antígenos musculares especialmente a desmina. Embora a desmina seja classificada como um marcador músculo-específico, ela pode ser encontrada em outros tumores não musculares. Cerca de 50% dos casos de sarcoma alveolar apresentam positividade para desmina, porém, essa positividade é focal ou limitada a poucas células. Foschini e Eusebi (1994) referiram que a positividade para actina (de músculo liso e estriado), desmina e MyoD1 favoreceria a hipótese de diferenciação muscular desta neoplasia ⁽⁵⁴⁾. Wang et al (1996) estudaram 12 casos de

sarcoma alveolar com uma série de marcadores musculares, e encontraram positividade para desmina em 06 tumores e negatividade para mioglobina, actina músculo específico, miogenina e MyoD1. Curiosamente em 11 tumores houve imuno-expressão granular citoplasmática para o Myo D1 (clone 5.8 A). Estudos de Western Blot com material a fresco disponível evidenciaram presença de banda de 53Kda com o anticorpo anti-desmina e ausência de banda de 45 Kda para o anticorpo anti- MyoD1 (clone 5.8 A). Tal achado sugere que a imuno-expressão citoplasmática do MyoD1 observada representaria uma reação cruzada não específica com um antígeno citoplasmático e colocaria em dúvida a histogênese muscular do sarcoma alveolar de partes moles⁽⁵⁵⁾.

SARCOMA EPITELIÓIDE

O Sarcoma epitelióide é um tumor raro, de histogênese incerta, ocorrendo principalmente em crianças e adultos jovens^(56,57).

O padrão imuno-histoquímico típico do sarcoma epitelióide é co-expressão de citoqueratina e vimentina encontrado em 75% a 100% dos casos. Outro marcador epitelial frequentemente expressado é o EMA (positivo em 60% a 100% dos casos).

É sabido que os sarcomas epitelióides expressam CD34, o que pode auxiliar em muito o diagnóstico diferencial de tais tumores com os carcinomas metastáticos e sarcomas sinoviais, que são em geral CD34 negativos⁽⁵⁸⁾.

Hazelbag et al (1996) estudaram subtipos de citoqueratinas em sarcomas epitelióides, observando positividade em todos os casos analisados para CKs 8/18, positividade para CKs 14 e 19 em aproximadamente metade dos tumores e negatividade para CK7 na totalidade dos casos avaliados. Os autores sugerem que a negatividade para CK7 nos sarcomas epitelióides pode ser útil em diferenciar tais neoplasias de adenocarcinomas metastáticos e sarcomas sinoviais, principalmente quando a formação glandular é ausente⁽⁵⁹⁾.

TUMOR RABDÓIDE

Haas et al (1981) foi quem primeiro descreveu este tumor como sendo uma tipo de tumor renal em crianças pequenas. Desde então vários casos renais e extra-renais foram relatados. Em partes moles, esta neoplasia altamente maligna e rara, tem sua existência questionada como entidade⁽⁶⁰⁾. Não existe um consenso se tal tumor representa uma entidade clinico-patológica distinta ou um fenótipo comum a uma série de neoplasias. Suas células demonstram a presença de inclusões citoplasmáticas, cujo estudo de microscopia eletrônica demonstrou serem filamentos intermediários, que imuno-reagem para vimentina e citoqueratinas^(61,62).

SARCOMA DE CÉLULAS CLARAS (MELANOMA DE PARTES MOLES)

O padrão imuno-histoquímico para sarcoma de células claras (melanoma de partes moles) é semelhante ao melanoma cutâneo. A presença de HMB-45 e proteína S-100 tem sido demonstrada e com forte intensidade. Marcadores muscular e citoqueratinas são negativos neste tumor^(63,64,65).

SARCOMA SINOVIAL

Quando o sarcoma sinovial se apresenta na forma clássica bifásica não há dificuldade diagnóstica. Entretanto, quando o componente epitelial não está presente ou este tumor é do tipo monofásico, o seu diagnóstico se torna um desafio ⁽⁶⁶⁾. O sarcoma sinovial monofásico é facilmente confundido com outros sarcomas que apresentam o padrão semelhante incluindo por exemplo o schwannoma maligno e o hemangiopericitoma. O achado imuno-histoquímico mais importante é a expressão de marcadores epiteliais, especialmente a citoqueratina, que é expressa não só no componente epitelial mas, também nas células fusiformes do tumor ⁽⁶⁷⁾. A maioria dos sarcomas sinoviais expressam além da citoqueratina e EMA, bcl-2, CD99 e proteína S100 e são negativos para o CD34 ^(68,69,70,71). Em uma análise de 20 sarcomas sinoviais pouco diferenciados, van de Rijn et al (1999) encontraram 95% de positividade para o EMA, 42% para citoqueratina e 63% para a proteína S100 ⁽⁷²⁾. Machen et al (1999) estudaram o perfil de 21 sarcomas sinoviais pouco diferenciados e 13 PNET e encontraram nos sarcomas sinoviais positividade em todos os casos para pelo menos uma citoqueratina, positividade para A1/AE3 em 62% dos casos, CK7 em 52%, CK19 em 43% e 32% de positividade para CD99 em padrão citoplasmático e não membranoso, em contraste, 92% dos PNET imuno-expressaram CD99 em padrão membranoso, CK19 em 15% e AE1/AE3 focalmente em 31%. Não houve imuno-expressão de CK7. Os autores sugerem que a positividade para CK7 pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre estes dois tumores ⁽⁷³⁾. Suster et al (1998) encontraram forte positividade nas áreas fusiformes dos sarcomas sinoviais para o bcl-2. Em estudo de 39 sarcomas sinoviais (15 bifásicos e 24 monofásicos) houve reatividade para citoqueratina e EMA em todos os casos bifásicos e 15 (63%) dos casos monofásicos demonstraram positividade para ceratina 7 para EMA ⁽⁷¹⁾.

ANGIOSSARCOMA

O diagnóstico histológico do angiossarcoma bem diferenciado geralmente não é apresenta alto grau de dificuldade, especialmente quando o tumor se apresenta na sua forma clássica. Contudo, o seu diagnóstico pode ser difícil quando é predominantemente sólido e com padrão epitelioide ou fusocelular. Nestes casos, a imunocoloração para os marcadores endoteliais é fundamental para aumentar a precisão diagnóstica ⁽⁷⁴⁾. Os marcadores endoteliais mais específicos são Fator VIII e o CD31 ^(75,76,77). Outros marcadores que podem ser utilizados são o CD34 e o Ulex europaeus, sendo sensíveis para este tumor, porém com especificidade menor que o Fator VIII ou CD31 ^(58,78,79). O *Ulex europaeus* é uma lecitina que reconhece o resíduo glicosil-terminal do antígeno H em hemácias e endotélio. É altamente sensível (aproximadamente 90% de positividade), mas é positiva também no sarcoma epitelioide e em carcinomas metastáticos ⁽⁷⁵⁾. O CD34, também, pode ser expresso em outros tumores mesenquimais incluindo o tumor estromal gastrointestinal ⁽⁵⁸⁾. Aproximadamente 20% dos angiossarcomas, particularmente os predominantemente sólidos, são negativos para Fator VIII daí a necessidade do uso de painel de anticorpos.

LIPOSSARCOMAS, HEMANGIOPERICITOMAS E FIBRO-HISTIOCITOMAS MALIGNOS

Não existem marcadores específicos para o lipossarcoma. De certa utilidade pode ser a imuno-expressão da proteína S100. Dei Tos et al (1996) analisaram 100 casos de lipossarcomas utilizando o antisoro policlonal anti-proteína S100 e encontraram positividade em 65% dos lipossarcomas bem diferenciados, 36% dos mixóides/células

redondas e em 54% dos pleomórficos. O componente fusiforme do mixóide foi positivo em 40% dos casos e as áreas indiferenciadas de células redondas do subtipo mixóide/células redondas imuno-expressou a proteína S-100 em 50%. Os tumores puramente de células redondas foram positivos em 71% dos casos. Os autores concluíram que esta positividade poderia auxiliar na diferenciação do lipossarcoma de células redondas de outras neoplasias de células redondas, bem como tornava mais fácil o reconhecimento da variante pleomórfica⁽⁸⁰⁾. Entretanto a negatividade para este marcador não exclui o diagnóstico de lipossarcoma.

Uma série de tumores podem conter áreas hemangiopericíticas, principalmente os fibro-histiocitomas malignos, os sarcomas sinoviais e os condrossarcomas mesenquimais. Salientamos que nos sarcomas sinoviais a imuno-expressão de citoqueratina e nos condrossarcomas mesenquimais a positividade para a proteína S100 podem auxiliar no diferencial. Tem sido relatada positividade para o CD34 em hemangiopericitomas e isto pode ser útil no diferencial com os sarcomas sinoviais que são CD34 negativos⁽⁸¹⁾. Tem sido sugerido que esta expressão pode estar relacionada a uma origem comum, da célula endotelial e pericítica⁽⁸²⁾.

Não existem marcadores para o fibro-histiocitoma maligno. O anticorpo monoclonal KP1 que reconhece o-CD68, glicoproteína de peso 110 Kd encontrada nos lisossomos de monócitos, macrófagos e em grânulos de neutrófilos têm sido positivo em outros tumores^(83,84,85,86). Parece que o anticorpo detecta riqueza de lisossomos nas células mais do que diferenciação histiocítica⁽⁸³⁾. Outro aspecto importante é a riqueza de histiócitos reacionais em uma série de outras neoplasias, os quais seriam realçados pelo método imuno-histoquímico, podendo levar a um diagnóstico errôneo. Outro dado é que nos próprios fibro-histiocitomas malignos a imuno-expressão é inconstante. Outros anti-macrófagos tais como o MAC387 e o HAM56 também carecem de especificidade.

SCHWANNOMA MALIGNO

A proteína S-100, a proteína mielina básica e o Leu-7 são marcadores mais comumente utilizados no diagnóstico do schwannoma maligno. A proteína S100, recebe este nome por ser 100% solúvel em sulfato de amônia, trata-se de uma proteína de baixo peso molecular pertencente ao grupo das calmodulinas (famílias das proteínas ligadoras de Ca⁺⁺), presente em numerosas células tais como células de Schwann, melanócitos, células de Langerhans, histiócitos, condrócitos e lipócitos, além de células mio-epiteliais⁽⁸⁷⁾. Ao contrário dos schwannomas benignos, que usualmente expressam proteína S-100, somente metade dos schwannomas malignos reagem com este marcador, e a positividade geralmente é focal e limitada a pequeno número de células. Tal dado aliado ao aspecto morfológico ajuda a diferenciar os schwannomas celulares dos tumores malignos, pois os primeiros expressam a proteína S100 de maneira difusa⁽⁸⁸⁾. Apesar desta limitação, em alguns casos, o estudo imuno-histoquímico auxilia na distinção entre schwannoma maligno, que apresenta padrão estoriforme ou fibrossarcoma-like, do FHM e dos fibrossarcomas, isso porque esses tumores são negativos para proteína S-100.

A interpretação da positividade para proteína S100 deve ser analisada com cautela uma vez que tumores de outra linhagem celular, por exemplo melanomas podem expressar fortemente esta proteína não sendo infreqüente melanomas apresentarem-se à morfologia como neoplasias fusocelulares.

A proteína básica mielínica tem sido utilizada como marcador de neoplasias de bainha nervosa periférica, bem como o receptor de fator de crescimento do nervo, tendo este último resultados superiores ao primeiro. Um outro marcador que foi inicialmente

descrito como reconhecendo células natural- Killer, o CD57 HNK1 (Leu 7) reconhece uma glicoproteína lábil associada à mielina sendo também útil neste tipo de neoplasia ⁽⁸⁹⁾.

Outro aspecto importante é a expressão de colágeno e laminina, sendo esta última de utilidade no diagnóstico diferencial com tumores fibroblásticos, em geral laminina negativos ⁽⁹⁰⁾.

É sabido que tais tumores podem apresentar componente rabdomioblástico (ectomesenquimomas) e expressarem nestas áreas marcadores musculares, bem como áreas glandulares (Shwannoma glandular) e imuno-expressarem EMA e citoqueratinas ⁽⁹¹⁾, tornando neste caso, o diagnóstico diferencial com sarcomas sinoviais particularmente difícil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Enterline HT Histopathology of sarcomas Seminars in Oncology 1981, 8 : 133-155.
2. Grucha A, Niezabitowski A, Wasilewska A, Sikora K, Rys J, Szklarski W, Jaszcz A, Lackowska B, Herman K Rhabdomyosarcoma. Morphologic, immunohistochemical, and DNA study. Gen. Diagn. Pathol. 1997; 142:3-4, 175-84.
3. Hibshoosh H, Lattes R. Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer. Semin. Oncol. 1997; 24:5, 515-25.
4. Tsokos M, Howard R, Costa J. Immunohistochemical study of alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. Lab. Invest. 1983; 48: 148-155.
5. Miettinen N. Immunohistochemistry of soft tissue tumors. Brief review of selected problems. ARMIS 1990; 98: 191-199.
6. Carter RL, Mc Carthy KP, Machin LG, Jameson CF, Philp ER, Pinkerton CR. Expression of desmin and myoglobin in rhabdomyosarcomas and in developing skeletal muscle. Histopathology 1989; 15: 585-595.
7. Scupham R, Gilbert EF, Wilde J, Wiedrich TA. Immunohistochemical studies of rhabdomyosarcoma. Arch. Pathol. Lab. Med. 1986; 110: 818-821.
8. Schmidt D, Reimann O, Treuner J, Harms D. Cellular differentiation and prognosis in embryonal rhabdomyosarcoma. Virchows Arch. (Pathol Anat) 1986.
9. Truong LD, Rangdaeng S, Cagle P, Ro JY, Hawkins H, Font RL. The diagnostic utility of desmin: a study of 584 cases and review of the literature. Am. J. Clin. Pathol. 1990; 93: 305-314.
10. Kodet R. Rhabdomyosarcoma in childhood: an immunohistological analysis with myoglobin, desmin and vimentin. Path. Res. Pract. 1989; 185: 207-213.
11. Dodd S, Malone M, McCulloch W. Rhabdomyosarcoma in children: a histological and immunohistochemical study of 59 cases. J. Pathol. 1989; 158: 13-18.
12. Molenaar WM, Oosterhuis JW, Oosterhuis AM, Ramaeker FCS. Mesenchymal and muscle-specific intermediate filaments (vimentin and desmin) in relation to differentiation in childhood rhabdomyosarcomas. Hum. Pathol. 1985; 16: 838-843.
13. de Alava E, Lozano MD, Sola I, Panizo A, Idoate MA, Martínez Isla C, Forteza J, Sierrasesúmaga L, Pardo Mindán FJ. Molecular features in a biphenotypic small cell sarcoma with neuroectodermal and muscle differentiation. Hum. Pathol. 1998; 29:2, 181-4.
14. Tsukada T, Tippens D, Gordon D, Ross R, Gown AM. HHH35 a muscle-actin-specific monoclonal antibody: II Reactivity in normal, reactive and neoplastic human tissues. Am. J. Pathol. 1987; 127: 389-402.
15. Tsukada T, Tippens D, Gordon D, Ross R, Gown AM. HHF35 a muscle actin specific monoclonal antibody: I Biochemical and immunocytochemical characterization. Am. J. Pathol. 1987; 126: 51-60.
16. Battifora H. Immunohistochemistry in tumor diagnosis Handout-short course United States and Canadian Academy of Pathology 1992.
17. Carter RL, Hall JM. A note on immunohistochemical staining for sarcomeric actin in rhabdomyosarcomas and other round cell tumor. Histopathology 1992; 21: 575-577.
18. Hasegawa T, Matsuno Y, Niki T, Hirohashi S, Shimoda T, Takayama J, Watanabe C, Kaneko A, Sano T, Sato M, Suzuki J. Second primary rhabdomyosarcomas in patients with bilateral retinoblastoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. Am. J. Surg. Pathol. 1998; 22:1351-60.
19. Schmidt RA, Cone R, Haas JE, Gown AM. Diagnosis of rhabdomyosarcoma with HHF35 a monoclonal antibody directed against muscle actin. Am. J. Pathol. 1988; 131; 19-28.
20. Dias P, Parham DM, Shapiro DN, Webber BL, Houghton PJ. Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childhood solid tumors diagnostic utility in rhabdomyosarcoma. Am. J. Pathol. 1990; 137: 1283-1291.
21. Scoble H, Witte D, Shimada H. Molecular differential pathology in rhabdomyosarcoma Genes Chrom. Cancer 1989; 1: 23-35.

22. Dias P, Parham DM, Shapiro DN, Tapscott SJ, Houghton PJ. Monoclonal antibodies to the Myogenic Regulatory Protein MyoD1: Epitope Mapping and Diagnostic Utility. *Cancer Res.* 1992; 52: 6431-6439.
23. Tsokos M, Dias P, Jefferson J, Houghton PJ. Detection of the MyoD1 gene product in paraffin sections of pediatric tumors. *Mod. Pathol.* 1994; 7: 148^A.
24. Parham DM. Rhabdomyosarcoma and related tumors in Pediatric Neoplasia Morphology and Biology Lippincott Raven 1996; 87-104.
25. Tallini-G, Parham-DM, Dias-P, Cordon-Cardo-C, Houghton-PJ, Rosai J. Myogenic regulatory protein expression in adult soft tissue sarcomas: A sensitive and specific marker of skeletal muscle differentiation. *Am. J. Pathol.* 1994; 144/4 (693-701).
26. Wesche WA, Fletcher CDM, Dias P, Houghton PJ, Parham DM. Immunohistochemistry of Myo D1 in adult pleomorphic soft tissue sarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995; 19: 261-269.
27. Rubin BP, Hasserjian RP, Singer S, Janecka I, Fletcher JA, Fletcher CD. Spindle cell rhabdomyosarcoma (so called) in adults: report of two cases with emphasis on differential diagnosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22: 459-464.
28. Wang NP, Marx J, McNutt MA, Rutledge J, Gown AM. Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumor of childhood: an immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* 1995; 8: 13A.
29. Weiss SW and Brooks JS in *Soft tissue tumors* 1996 ed United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.
30. Antonescu CR, Erlandson RA, Huvos AG. Primary leiomyosarcoma of bone: a clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of 33 patients and a literature review. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997; 21:11, 1281-94.
31. Khoddami M, Bedard YC, Bell RS, Kandel RA. Primary leiomyosarcoma of bone: report of seven cases and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1996; 120: 7, 671-5.
32. Moran CA, Suster S, Abbondanzo SL, Koss MN. Primary leiomyosarcomas of the lung: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 18 cases. *Mod. Pathol.* 1997; 10:2, 121-8.
33. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* 1986; 103: 2787-96.
34. Rizeq-MN, Van-de-Rijn-M, Hendrickson-MR, Rouse-RV. A comparative immunohistochemical study of uterine smooth muscle neoplasms with emphasis on the epithelioid variant. *Hum. Pathol.* 1994; 25/7 (671-677).
35. Leong ASY, Vinyuvat S, Suthipintawong C, Leong FJ. Patterns of basal lamina immunostaining in soft-tissue and bony tumors. *Appl. Immunohistochem.* 1997; 5(1): 1-7.
36. Schurch W, Begin LR, Seemayer TA, Lagace R, Boivin JC, Lamoureux C, Bluteau P, Piche J, Gabbiani G. Pleomorphic soft tissue myogenic sarcomas of adulthood. A reappraisal in the mid-1990s. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20 : 131-147.
37. Hill MA, Araya JC, Eckert MW, Gillespie AT, Hunt JD, Levine EA. Tumor specific Epstein-Barr virus infection is not associated with leiomyosarcoma in human immunodeficiency virus negative individuals. *Cancer* 1997; 80: 204-210.
38. Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH. Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood. *Cancer* 1979; 43: 2438-2451.
39. Gonzales-Crussi F, Wolfson SL, Misugi K, Nakajima T. Peripheral Neuroectodermal Tumors of the chest wall in childhood. *Cancer* 1984; 54: 2519-2527.
40. Linnoila RI, Tsokos M, Triche J, Marangos PJ, Chandra RS. Evidence for neural origin and PAS- Positive variants of the malignant small cell tumor of thoracopulmonary region ("Askin Tumor"). *Am. J. Surg. Pathol.* 1986; 10: 124-133.
41. Dehner LP. Primitive Neuroectodermal Tumor and Ewing's Sarcoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993; 17: 1-13.
42. Raney RB, Asmar L, Newton WA Jr, Bagwell C, Breneman JC, Crist W, Gehan EA, Webber B, Wharam M, Wiener ES, Anderson JR, Maurer HM. Ewing's sarcoma of soft tissues in childhood: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972 to 1991. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:2, 574-582.

43. Kushner BH, Hadju SI, Gulati SC, Erlanson RA, Exelby PR, Lieberman PH. Extracranial primitive neuroectodermal tumors. The Memorial Sloan Kettering Cancer Center Experience. *Cancer* 1991; 67 : 1825-1829.
44. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzër-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's Sarcoma and Peripheral Primitive Neuroectodermal tumors: Evidence for a common histogenesis of Ewing's Sarcoma and Peripheral Primitive Neuroectodermal tumors from MIC2 Expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991; 67: 1886-1893.
45. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Glasser DB, Huvos AG, Rettig WJ. Comparison of cell surface antigen HBA-71 (P30/32 MIC2), neuron-specific enolase and vimentin in the immunohistochemical analysis of Ewing's Sarcoma of bone. *Am. J. Surg. Pathol.* 1992; 16: 746-755.
46. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Su SL, DeAngelis P, Lane JM, Rettig WJ. Biochemical and genetic characterization of the HBA71 Ewing's Sarcoma cell surface antigen. *Cancer Res.* 1991; 51:336-340.
47. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's Sarcoma cell surface antigen P30/32 MIC2. *Am. J. Pathol.* 1991; 139: 317-325.
48. Stevenson AJ, Chatten J, Bertoni F, Miettinen M. CD99 (P30/32 MIC2) Neuroectodermal/ Ewing's Sarcoma antigen as an immunohistochemical marker. Review of more than 600 tumors and the literature experience. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2: 231-240.
49. Pappo AS, Douglass EC, Meyer WH, Marina N, Parham DM. Use of HBA71 and anti- β 2-microglobulin to distinguish Peripheral Neuroepithelioma from Neuroblastoma. *Hum. Pathol.* 1993; 24: 880-885.
50. Perlman EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, Link MP. Ewing's Sarcoma – routine diagnostic utilization of MIC2 analysis. A pediatric Oncology Group/ Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 304-307.
51. Vartanian RK, Sudilovsky D, Weidner N. Immunostaining of monoclonal antibody O13 (anti-MIC2 gene product (CD99)) in lymphomas. Impact of Heat- induced Epitope Retrieval. *Appl Immunohistochem.* 1996; 4: 43-55.
52. Weidner N, Tjoe J. Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: antibody that recognizes glycoprotein p30/32 MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's Sarcoma and Peripheral Neuroepithelioma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994; 18: 486-494.
53. Christopherson WM, Foote FW, Stewart FW. Alveolar soft part sarcomas. Structurally characteristic tumors of uncertain histogenesis. *Cancer* 1952; 5: 100-111.
54. Pappo AS, Parham DM, Cain A, Luo X, Bowman LC, Furman WL, Rao BN, Pratt CB. Alveolar soft part sarcoma in children and adolescents: clinical features and outcome of 11 patients. *Med. Pediatr. Oncol.* 1996; 26:2, 81-4.
55. Foschini-MP, Eusebi-V. Alveolar soft-part sarcoma: A new type of rhabdomyosarcoma? *Semin-Diagn-Pathol.* 1994; 11/1 (58-68).
56. Wang NP, Bacchi CE, Jiang JJ, McNutt MA, Gown AM. Does alveolar soft-part sarcoma exhibit skeletal muscle differentiation? An immunocytochemical and biochemical study of myogenic regulatory protein expression. *Mod. Pathol.* 1996; 9:5, 496-506.
57. Kodet-R, Smelhaus-V, Newton-WA Jr, Hamoudi-AB, Qualman-SJ, Singley-C, Jacobs-DL. Epithelioid sarcoma in childhood: An immunohistochemical, electron microscopic, and clinicopathologic study of 11 cases under 15 years of age and review of the literature. *Pediatr. Pathol.* 1994; 14/3: (433-451).
58. Evans HL, Baer SC. Epithelioid sarcoma: A clinicopathologic and prognostic study of 26 cases. *Semin. Diagn. Pathol.* 1993; 10/4: (286-291).
59. Van de Rijn M, Rouse RV. CD34 A review. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2(2): 71-80.
60. Hazelbag HM, Mooi WJ, Fleuren GJ, Hogendoorn PCW. Chain-specific keratin profile of epithelioid soft-tissue sarcomas. An immunohistochemical study on synovial sarcoma and epithelioid sarcoma. *Appl. Immunohistochem.* 1996; 4/3: (176-183).
61. Parham DM, Weeks DA, Beckwith JB. The clinicopathologic spectrum of putative extrarenal rhabdoid tumors: An analysis of 42 cases studied with immunohistochemistry or electron microscopy. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994; 18/10: (1010-1029).

62. Kaiserling E, Ruck P, Handgretinger R, Leipoldt M, Hipfel R. Immunohistochemical and cytogenetic findings in malignant rhabdoid tumor. *Gen. Diagn. Pathol.* 1996; 141:5-6, 327-37.
63. Wick MR, Ritter JH, Dehner LP. Malignant rhabdoid tumors: A clinicopathologic review and conceptual discussion. *Semin. Diagn. Pathol.* 1995; 12/3: (233-248).
64. Graadt van Roggen JF, Mooi WJ, Hogendoorn PC. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses (malignant melanoma of soft parts) and cutaneous melanoma: exploring the histogenetic relationship between these two clinicopathological entities. *J. Pathol.* 1998; 186(1):3-7.
65. Mackey SL, Hebel J, Cobb MW. Melanoma of the soft parts (clear cell sarcoma): a case report and review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998; 38(5 Pt 2):815-9.
66. d'Amore ES, Ninfo V. Clear cell tumors of the somatic soft tissues. *Semin. Diagn. Pathol.* 1997; 14:270-80.
67. Machen SK, Easley KA, Goldblum JR. Synovial sarcoma of the extremities: a clinicopathologic study of 34 cases, including semi-quantitative analysis of spindled, epithelial, and poorly differentiated areas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1999; 23:268-75.
68. Ferrari A, Casanova M, Massimino M, Luksch R, Cefalo G, Lombardi F, Galimberti S, Riganti G, Fossati-Bellani F. Synovial sarcoma: report of a series of 25 consecutive children from a single institution. *Med. Pediatr. Oncol.* 1999; 32:32-7.
69. Fisher C. Synovial sarcoma. *Ann. Diagn. Pathol.* 1998; 2:401-21.
70. Pilotti S, Mezzelani A, Azzarelli A, Rilke F, Pierotti MA. bcl-2 expression in synovial sarcoma. *J. Pathol.* 1998; 184:337-9.
71. Viguer JM, Jimenez-Heffernan JA, Vicandi B, Lopez-Ferrer P, Gamallo C. Cytologic features of synovial sarcoma with emphasis on the monophasic fibrous variant: a morphologic and immunocytochemical analysis of bcl-2 protein expression. *Cancer* 1998; 25,84(1):50-6.
72. Suster S, Fisher C, Moran CA. Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces, and gastrointestinal tract. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22: 863-72.
73. van de Rijn M, Barr FG, Xiong QB, Hedges M, Shipley J, Fisher C. Poorly differentiated synovial sarcoma: an analysis of clinical, pathologic, and molecular genetic features. *Am. J. Surg. Pathol.* 1999; 23:106-12.
74. Machen SK, Fisher C, Gautam RS, Tubbs RR, Goldblum JR. Utility of cytokeratin subsets for distinguishing poorly differentiated synovial sarcoma from peripheral primitive neuroectodermal tumour. *Histopathology* 1998; 33:501-7.
75. Meis-Kindblom JM, Kindblom LG. Angiosarcoma of soft tissue: a study of 80 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22:683-97.
76. DeYoung BR, Swanson PE, Sirgi KE, Fitzgibbon JF, Wick MR. CD31 immunoreactivity is specific for endothelial differentiation in human neoplasms. *Mod. Pathol.* 1993; 6:5^A.
77. Miettinen M, Lindenmayer AE, Choubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34 and BNH9 antibody to H and Y antigens – evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod. Pathol.* 1994; 7: 82-90.
78. DeYoung BR, Wick MR, Fitzgibbon JF, Sirgi KE, Swanson PE. CD31: An immunospecific marker for endothelial differentiation in human neoplasms. *Appl. Immunohistochem.* 1993; 1: 97-100.
79. Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: Assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. *Histopathology* 1990; 17: 237-242.
80. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J. Clin. Pathol.* 1990; 43: 752-757.
81. Dei Tos AP, Wadden C, Fletcher CD. S100 protein staining in Liposarcoma. Its diagnostic utility in the high-grade myxoid (round cell) variant. *Appl. Immunohistochem.* 1996; 4: 95-101.
82. Van de Rijn M, Rouse RV. CD34. A review. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2: 71-80.
83. Traweek ST, Kandalaf PL, Mehta P, Battifora H. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991; 96: 25-31.

84. Tsang WY, Chan JK. KP1 (CD68) staining of granular cell neoplasms: Is KP1 a marker for lysosomes rather than histiocytic lineage? *Histopathology* 1992; 21: 84-86.
85. Cassidy M, Loftus B, Whelan A, Sabt B, Hickey D, Henry K, Leader M. KP1: Not a specific marker. Staining of 137 sarcomas, 48 lymphomas, 28 carcinomas, 7 malignant melanomas and 8 cystosarcomas phyllodes. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 1994; 424: 635-640.
86. Weiss LM, Arber DA, Chang KI. CD68: A review. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2: 2-8.
87. McHugh M, Miettinen M. KP1 (CD68): its limited specificity for histiocytic tumors. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2: 186-190.
88. Schmitt FC, Bacchi CE. "S100 protein: is it useful as a tumour marker in diagnostic immunocytochemistry?" *Histopathol.* 1989; 15: 281-288.
89. Weiss SW, Langloss JM, Enzinger FM. Value of S100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab. Invest.* 1983; 49: 299-308.
90. Arber DA, Weiss LM. CD57: a review. *Appl. Immunohistochem.* 1995; 3: 137-152.
91. Miettinen M, Foidart JM, Ekblom P. Immunohistochemical demonstration of laminin, the major glycoprotein of basement membranes, as an aid in the diagnosis of soft tissue tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 1983 79: 306-311.
92. Karabela Bouropoulou V, Antoniou D, Liapi Avgeri G. Malignant peripheral nerve sheath tumor with glandular differentiation. Report of a case with emphasis to the usefulness of immunohistochemistry in the differential diagnosis. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* 1996; 44:5-6, 263-8.

3. CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIOS PRIMÁRIOS DE CARCINOMAS METASTÁTICOS

Carlos E. Bacchi

Atualmente a imuno-histoquímica tem importante papel na caracterização de sítio primário de carcinoma metastático. O ideal, quando nos deparamos com um caso de carcinoma metastático, sem informações clínicas precisas sobre o sítio primário, é utilizar painel de marcadores tumorais e não reagente isolado. Com a análise, em conjunto, dos resultados destes marcadores, freqüentemente podemos direcionar ou mesmo precisar o sítio primário de determinado carcinoma metastático. Com o objetivo de facilitar a discussão dos marcadores utilizados nesta abordagem diagnóstica apresentamos 6 estratégias imuno-histoquímicas diferentes. Freqüentemente os painéis discutidos abaixo são utilizados de maneira complementar, mesclando-se marcadores dos diferentes grupos. Com a finalidade de facilitar o entendimento do texto, principalmente em relação à sensibilidade dos anticorpos ou painéis, definimos deste já, os seguintes termos: *em geral expressão ausente*: quando a expressão de determinado marcador não ultrapassa 10% dos casos; por exemplo, expressão de CEA em carcinoma de próstata. *Expressão variável*: quando a expressão de determinado antígeno está em torno de 50% dos casos; por exemplo aproximadamente 50% dos casos de carcinoma de ovário expressam CEA.

ESTRATÉGIAS

Estratégia 1 - Citoqueratinas de alto e baixo peso molecular (PM)

Em relação ao peso molecular (PM), as citoqueratinas podem ser divididas em dois subgrupos: citoqueratinas de alto PM e citoqueratinas de baixo PM^(3,4). Esta divisão tem se mostrado útil em agrupar carcinomas de diferentes origens (Tabela 1). Existem alguns reagentes anti-citoqueratinas, que estão disponíveis comercialmente e, que conseguem discriminar entre estes dois subgrupos de citoqueratinas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais 34 β E12 e 35 β H11 reconhecem citoqueratinas de alto PM e baixo PM, respectivamente^(3,4). A utilização destes dois anticorpos monoclonais, ou de seus equivalentes na literatura, para caracterização de carcinomas, já tem sido amplamente estudada e apresenta uso consagrado^(3,4). No Grupo 1 estão listados os carcinomas que freqüentemente expressam apenas citoqueratina de baixo PM. No Grupo 2, estão os carcinomas que usualmente co-expressam citoqueratinas de alto e baixo PM e no Grupo 3 está o carcinoma escamoso que, na maioria dos casos, só expressa citoqueratina de alto PM. Embora a estratégia do uso de reagentes discriminatórios dos diferentes grupos de citoqueratinas mostre-se geralmente útil, os carcinomas por vezes podem não seguir a divisão apresentada na Tabela 1. Por exemplo, alguns carcinomas escamosos, embora menos comumente, podem co-expressar citoqueratina de baixo PM; alguns carcinomas renais e colônicos podem co-expressar citoqueratina de alto PM. Por outro lado, casos de carcinomas que normalmente só expressam citoqueratina de baixo PM, mas que apresentam áreas de diferenciação escamosa, são imunorreativos para citoqueratina de alto PM nestas áreas. O padrão de expressão destas citoqueratinas também é importante na avaliação do sítio primário dos carcinomas metastáticos. Os adenocarcinomas do cólon, por exemplo, podem como mencionado, apresentar expressão de citoqueratina de alto PM, mas em geral esta positividade é focal nas células tumorais e de padrão sub-plasmalêmico (sub-membranoso), simulando a imunorreatividade da mucosa colônica normal.

Tabela 1 – Subgrupos de carcinomas distribuídos de acordo com a expressão de citoqueratinas (CK) de alto e baixo PM

Grupo 1 Carcinomas de epitélio simples: CK Baixo PM + CK Alto PM -	Grupo 2 Carcinomas de epitélio complexo: CK Baixo PM + CK Alto PM -	Grupo 3 Carcinoma de epitélio escamoso: CK Baixo PM – CK Alto PM +
Hepatocarcinoma Carcinoma de células renais Carcinoma endometrial Carcinoma colônico Neoplasias Neuroendócrinas: Tumor carcinóide, Carcinoma de pequenas células Carcinoma prostático	Carcinoma mamário Carcinoma pancreático Carcinoma ovariano Adenocarcinoma pulmonar Carcinoma de células transicionais	Carcinoma escamoso

Estratégia 2 - Expressão de citoqueratinas 7 e 20 e CEA

Além de se utilizar citoqueratina para comprovar a natureza epitelial de neoplasias indiferenciadas, a expressão de determinado tipo de citoqueratina pode ajudar especificamente a caracterizar o carcinoma metastático em questão ^(2,3,4). Atualmente o nível de requinte no estudo da biologia das citoqueratinas chegou ao ponto de se dispor de anticorpos monoclonais contra quase todos os tipos individuais dessa complexa família de proteínas. Excelentes anticorpos monoclonais têm sido gerados contra citoqueratinas 1, 4, 5, 7, 13, 18, 19 e 20 ^(5,7,10,11,12,13).

Citoqueratina 7 é um polipeptídeo de 54 kD encontrado em vários epitélios simples, incluindo pulmão, cérvix, mama, ducto biliar e ductos coletores do rim, além de epitélio transicional da bexiga e mesotélio. Por outro lado, a citoqueratina 7 está ausente em epitélios do trato gastro-intestinal, túbulo proximal e distal do rim e epitélio escamoso ⁽¹³⁾. A maior utilidade do uso do anticorpo anti-citoqueratina 7 é a identificação de metástase de adenocarcinomas não-gastro-intestinais ^(5,11,13,14).

Citoqueratina 20, originalmente descrita no epitélio intestinal, foi posteriormente caracterizada em subgrupo de células epiteliais, tais como, células foveolares gástricas, células superficiais do urotélio e células de Merkel da pele ⁽⁷⁾. Esta distribuição seletiva da citoqueratina 20 tem utilidade no diagnóstico diferencial dos carcinomas de sítio primário desconhecido.

* Correlação da Expressão de Citoqueratinas 7 e 20 (CK7/CK20) ^(6,7,8,9,14)

Mais recentemente, vários estudos têm demonstrado que o uso simultâneo das CK7/CK20 pode ajudar na discriminação dos carcinomas metastáticos. Em estudo que realizamos recentemente ⁽¹⁴⁾ pesquisamos a expressão de CK7/CK20 em 384 carcinomas primários de vários órgãos e obtivemos algumas informações que têm se mostrado úteis na identificação de diferentes tipos de carcinomas. A Tabela 2 resume os principais achados deste estudo. Virtualmente todos os carcinomas de células transicionais de bexiga e adenocarcinomas de pâncreas são CK7+/CK20+; hepatocarcinoma, carcinoma de células renais, carcinoma da próstata, carcinoma

escamoso e neuro-endócrino do pulmão são CK7-/CK20-; o imunofenótipo CK7-/CK20+ é característico dos adenocarcinomas de origem colo-retal. CK7+/CK20- é observado nos carcinomas de outros sítios, incluindo pulmão, ovário, mama e endométrio. A expressão das citoqueratinas 7 e 20 é a mesma nos carcinomas primários e metastáticos, característica que torna o uso de ambas citoqueratinas essencial na avaliação do sítio primário dos carcinomas metastáticos ⁽¹⁴⁾.

Tabela 2 – Subgrupos de carcinomas distribuídos de acordo com a expressão habitual das citoqueratinas individuais 7 e 20			
Grupo 1 CK7: + CK20: +	Grupo 2 CK7: + CK20: -	Grupo 3 CK7: - CK20: +	Grupo 4 CK7: - CK20: -
Carcinoma de células transicionais Carcinoma mucinoso ovariano Carcinoma pancreático	Carcinoma mamário Adenocarcinoma pulmonar (grandes células) Carcinoma seroso ovariano Adenocarcinoma endometrial	Carcinoma colo-retal	Carcinoma hepatocelular Carcinoma de células renais Adenocarcinoma prostático Carcinoma escamoso Carcinoma neuroendócrino de pequenas células

- **Anticorpos Anti-CEA (CD66e)**

Antígeno carcinoembrionário (CEA) foi originalmente descrito no sistema digestivo humano, como antígeno tumoral associado. O CEA pertence a grande família de glicoproteínas de alto PM, que inclui as imunoglobulinas e certas moléculas de adesão celular. Atualmente, esta "superfamília" tem sido designada como CD66, incluindo as variantes CD66a, CD66b, etc; CEA é equivalente ao CD66e ⁽¹⁵⁾. A família CEA inclui o CEA "verdadeiro", o NCA (antígeno não específico de reação cruzada), BGP (glicoproteína biliar) e outros. Os anticorpos policlonais, normalmente comercializados no mercado, apresentam imunorreatividade para os três componentes da família CEA, ou seja, CEA, NCA e BGP. Embora a primeira vista esta diversidade de imunorreatividade pareça prejudicar a caracterização das neoplasias, ela na verdade, ajuda pelas seguintes razões: a) a reação positiva em NCA, presente nos neutrófilos e macrófagos, é útil no sentido de revelar controle interno da reação no tecido teste e b) a positividade no BGP é única e típica dos hepatocarcinomas, revelando padrão de canalículo-biliar. Existem também anticorpos monoclonais específicos contra o CEA, não reagentes com NCA e BGP.

A expressão de CEA é praticamente ausente em tumores não-epiteliais e presente em subgrupo previsível de carcinomas. Diferente dos filamentos intermediários, a expressão de CEA nos carcinomas correlaciona-se com o grau de diferenciação celular, isto é, tumores pouco diferenciados tendem a expressar menor quantidade de CEA, quando comparados com os carcinomas análogos bem diferenciados.

Em relação à expressão do CEA, em geral, os carcinomas podem ser divididos em três grupos (Tabela 3). No grupo 1 estão os carcinomas que apresentam intensa expressão do CEA e em elevada porcentagem dos casos (++) . Neste, estão incluídos os

adenocarcinomas primários do trato gastro-intestinal, principalmente do cólon, carcinomas do pulmão e mama. No grupo 2 estão os carcinomas que raramente expressam CEA (-): carcinomas de células renais e prostáticos. O grupo 3 corresponde ao grupo intermediário, onde a expressão do CEA é variável (+), tanto na intensidade quanto na frequência e sua importância diagnóstica é menos valiosa. Pertencendo a este último grupo estão os carcinomas de endométrio e ovário.

Tipos de Carcinomas	Expressão do CEA#
Carcinoma pulmonar de grandes células	(++)
Carcinoma pulmonar de pequenas células	(+)
Carcinoma colo-retal	(++)
Carcinoma mamário	(++)
Carcinoma de células transicionais	(+)
Carcinoma cervical	(+)
Carcinoma endometrial	(+)
Carcinoma ovariano	(+)
Carcinoma de células renais	(-)
Carcinoma prostático	(-)
Hepatocarcinoma	(++)(*)

(++) : expressão freqüente (>75% dos casos) e intensa; (+); expressão expressão variável (25-50% dos casos); (-): em geral ausente; (*): padrão canículo-biliar

Estratégia 3 - Co-expressão de Vimentina

Co-expressão de citoqueratina e vimentina é característica de subgrupo de carcinomas, incluindo principalmente os carcinomas de rim, endométrio e tireóide. Na Tabela 4 está resumida a expressão de vimentina em diferentes carcinomas.

Carcinomas que habitualmente co-expressam vimentina	Carcinomas que raramente co-expressam vimentina
Carcinoma de células renais Carcinoma endometrial Carcinoma de glândula salivar Carcinoma tireoideano Carcinoma fusocelular (independente da localização anatômica)	Carcinoma mamário Carcinoma ovariano Carcinoma pulmonar de pequenas e grandes células Carcinoma prostático Carcinoma gastro-intestinal

*Habitualmente: >75% dos casos; raramente: <10% dos casos

Estratégia 4 - Co-expressão de marcadores neuro-endócrinos

Neste grupo de marcadores estão incluídos a cromogranina A, sinaptofisina e NSE (enolase neuronal específica). O uso de anticorpos anti-NSE tem revelado pouca especificidade, mostrando positividade em inúmeros tumores não neuro-endócrinos,

inclusive em carcinomas de várias localizações, etc. Atualmente, graças à versatilidade do uso do forno de microondas, anticorpos anti-cromogranina A e anti-sinaptofisina estão entre os marcadores mais importantes e úteis na identificação da diferenciação neuro-endócrina em carcinomas, incluindo os de pequenas células do pulmão, que correspondem ao carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado. Há correlação direta entre grau de diferenciação do tumor e a expressão de cromogranina no tecido. A detecção de cromogranina é dependente da quantidade desta proteína nos neurogrânulos e a presença destes está diretamente relacionada à diferenciação tumoral. O uso dos anticorpos anti-marcadores neuro-endócrinos é importante principalmente em casos de carcinoma de células intermediárias ou grandes, quando a suspeita de diferenciação neuro-endócrina não é evidente. Exemplo desta situação é o carcinoma medular da tireóide metastático. Deve-se ter em mente que a expressão destes marcadores em carcinomas indica apenas diferenciação neuro-endócrina e não propriamente o sítio primário. Nestes casos, a pesquisa de outros peptídeos encontrados neste grupo de tumor pode ajudar na melhor caracterização do sítio primário, conforme ilustrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Peptídeos encontrados em carcinomas com diferenciação neuroendócrina; correlação com sítio anatômico

Tumores	Peptídeos ou marcadores expressados
Tumor de ilhota do pâncreas Carcinoma de pequenas células do pulmão Carcinoma medular da tireóide	Insulina, glucagon, somatostatina e gastrina Bomesina Calcitonina

Estratégia 5 - Anticorpos anti-proteínas específicas

Infelizmente existem poucos marcadores anti-proteínas tecido-específicas que podem ser utilizados na análise dos carcinomas metastáticos (Tabela 6). Entre os mais úteis e difundidos são os marcadores prostáticos, PSA (antígeno prostático específico) e PAP (fosfatase ácida prostática). O PSA é o mais específico deles, pois há alguns tumores, tais como carcinóides intestinais, nos quais há relatos de expressão do PAP ⁽¹⁾. Estes marcadores quando utilizados em conjunto conseguem identificar mais de 95% dos carcinomas prostáticos metastáticos, mesmo os mais indiferenciados. Outros marcadores considerados como tecido-específico são GCDFP-15 (*gross cystic disease fluid protein-15*) e tireoglobulina. Embora caracterizado na literatura como bom marcador para carcinoma de mama, o GCDFP-15, em nossa experiência, é positivo somente em minoria de carcinomas mamários, especialmente do tipo lobular infiltrante.

Tabela 6 – Anticorpos tecido-específico e imunorreatividade em carcinomas			
Anticorpos	Expressão em carcinomas	Sensibilidade	Especificidade
PSA	Carcinoma prostático	Alta	Alta
GCDFP-15	Carcinoma mamário	Baixa	Moderada
CAK1	Carcinoma ovariano seroso papilífero	Alta	Alta
Tireoglobulina	Carcinoma tireoideano	Alta	Alta
Proteína ApoA do surfactante	Carcinoma de grandes células do pulmão	Moderada	Alta

Sensibilidade alta: detecção de mais de 75% dos casos; baixa: <25% dos casos e moderada: 25-50%

Estratégia 6: Anticorpos anti receptores de estrógeno e progesterona

Utilizados num painel de marcadores, os anticorpos anti-receptores hormonais, estrógeno e progesterona, podem ser muito úteis na orientação de sítio primário de carcinomas metastáticos. É importante sempre lembrar que a expressão dos receptores hormonais não é privilégio dos carcinomas mamários, não sendo portanto específicos destes tumores. A Tabela 7 mostra os carcinomas que costumam expressar estes receptores e aqueles que raramente ou nunca o fazem.

Baseando-se nas informações da Tabela 7, numa situação em que uma paciente, com história de carcinoma de mama apresenta-se com nódulo pulmonar, e a dúvida é se o tumor em pulmão é metastático ou primário, a expressão de receptor de estrógeno, nas células tumorais, é praticamente diagnóstica de carcinoma de mama metastático, excluindo-se consequentemente carcinoma de grandes células primário de pulmão.

Finalmente, enfatizado que a aplicação de painéis de marcadores tumorais para caracterização de sítio primário de carcinoma metastático é apenas uma das ferramentas disponíveis e, sempre que possível, outros parâmetros, principalmente aspectos clínicos e métodos de imagem, devem ser também considerados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azumi N, Traweek ST, Battifora H. Prostatic acid phosphatase in carcinoid tumors. Immunohistochemical and immunoblot studies. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991; 15:785-90.
2. Debus E, Moll R, Franke WW et al. Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* 1984; 114:121.
3. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to intermediate filaments of human cells: unique and cross-reacting antibodies. *J. Cell. Biol.* 1982; 95:414.
4. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins: II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* 1984; 114:309.
5. Guerrieri C, Franlund B, Boeryd B. Expression of cytokeratin 7 in simultaneous mucinous tumors of the ovary and appendix. *Mod. Pathol.* 1995; 8:573-576.
6. Loy TS, Calaluce RD. Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102:764-767.
7. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke W. Cytokeratin 20 in human carcinomas. *Am. J. Pathol.* 1992; 140:427-47.
8. Rabenhorst SH, Bacchi CE. Expressão de citoqueratina 20 em carcinomas do pulmão. *J. B. Patol.* 1995; 31: 20-25.
9. Saveria AT, Torres FX, Linden MD, Bacchi CE, Gown AM, Zarbo RJ. Primary versus metastatic pulmonary adenocarcinoma. *Appl. Immunohistochem.* 1996; 4:86-94.
10. Ramaekers FCS, Huysman A, Schaart G et al. Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp. Cell. Res.* 1987; 170:235.
11. Ramaekers F, Van-Niekerk CC, Poels L et al. Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* 1990; 136:641-55.
12. Ueda G, Sawada M, Ogawa H et al. Immunohistochemical study of cytokeratin 7 for the differential diagnosis of adenocarcinomas in the ovary. *Gynecol. Oncol.* 1993; 51:219-23.
13. Van-Niekerk CC, Jap PH, Ramaekers FC et al. Immunohistochemical demonstration of keratin 7 in routinely fixed paraffin-embedded human tissues. *J. Pathol.* 1991; 165:145-52.
14. Wang NP, Zee S, Zarbo RJ, Bacchi CE, Gown AM. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. *Appl. Immunohistochem.* 1995; 3: 99-107.
15. Watt SM, Sala-Newby G, Hoang T, Gilmore DJ et al. CD66 identifies a neutrophil-specific epitope within the hematopoietic system that is expressed by members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules. *Blood* 1991; 78: 63-74.

4. MARCADORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA MAMÁRIO

Fernando C. Schmitt

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a imuno-histoquímica tem revolucionado a prática da Anatomia Patológica. Além do inestimável auxílio ao diagnóstico de diferentes tipos de neoplasia ⁽¹⁾, as técnicas imuno-histoquímicas têm permitido a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores, produtos de genes, etc.) que estão relacionados ao comportamento biológico das neoplasias. O objetivo deste capítulo é o de apresentar, baseado em nossa experiência pessoal e da literatura, os principais marcadores prognósticos utilizados em carcinoma de mama.

CARCINOMA DA MAMA E PROGNÓSTICO

O carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais prevalente no sexo feminino no mundo ocidental e uma das principais causas de morte por câncer. O avanço nos métodos de diagnóstico, quer através de métodos de imagem, quer da citologia aspirativa, tem permitido a detecção precoce deste tipo de neoplasia e uma intervenção terapêutica progressivamente mais adequada. No entanto, um dos aspectos mais extraordinários e pouco entendidos desta neoplasia é a variabilidade do seu comportamento biológico. A identificação de marcadores relacionados com recorrências, sobrevida e resposta terapêutica facilitará a compreensão do comportamento tumoral e, conseqüentemente, a identificação de pacientes de maior risco de recidivas e metastatização à distância. Nesta perspectiva é fundamental que os patologistas, clínicos, cirurgiões, oncologistas e mastologistas estejam informados de todos os fatores que possam estar correlacionados com o prognóstico de doentes com câncer de mama. Existe muita informação a este respeito na literatura médica mundial, tendo já sido descritos mais de uma centena de fatores potencialmente associados ao comportamento biológico dos tumores de mama. Embora o exame anatomopatológico tradicional, feito com qualidade, forneça dados fundamentais para o prognóstico, atualmente torna-se necessário o estudo de outros marcadores, determinados por técnicas adicionais como a citometria, biologia molecular e imuno-histoquímica. Estes marcadores constituem-se no conjunto como um Painel Prognóstico.

Um **marcador prognóstico** pode ser definido como qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, fornecer informações à respeito da sua evolução clínica. Para tal, este marcador deve estar relacionado à determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Este mesmo marcador também poderá ser considerado como **preditivo**, quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes suscetíveis a determinada terapêutica específica. O protótipo do marcador preditivo são os receptores hormonais que mediam a resposta à terapêutica hormonal adjuvante. No transcorrer deste capítulo iremos verificar que vários dos marcadores testados para determinar prognóstico também têm valor preditivo. Para ter validade, o marcador prognóstico deve possuir valor preditivo independente e com significado estatístico validado por testes clínicos. Além disto, deve ser detectado por

método sensível, confiável e reprodutível e deve ser de fácil interpretação pelos clínicos, sobretudo se tiver implicações terapêuticas.

A Tabela 1 demonstra os principais fatores prognósticos estudados em carcinoma da mama, sendo que enfatizaremos neste capítulo aqueles de maior utilização e que são determinados por métodos imuno-histoquímicos.

Tabela 1 – Marcadores prognósticos em carcinoma de mama

Estabelecidos

Envolvimento axilar
Tamanho do tumor
Tipo e grau histológico
*Receptores hormonais **
*Índice proliferativo **

Potencialmente úteis

Invasão vascular
*Oncogenes (c-erbB2) **
*Genes supressores de tumor (p53) **
Ploidia
*Angiogênese **
*Catepsina D **
*Fatores de crescimento e seus receptores **
*Sialyl-Tn **

Em estudos experimentais

nm23, bax/bcl-2*, metalotioninas*, receptores de laminina*, cadherinas*, ps2*, p-glicoproteína*, Ciclina D1*, p21*, p27*, CD 44**
Receptores de vitamina D
BRCA-1 e 2
Fase do ciclo em que foi realizada a mastectomia

* Podem ser determinados por imuno-histoquímica

MARCADORES

1. Receptores de Estrógeno e Progesterona

Introdução

Os receptores hormonais (receptores de estrógeno - RE e de progesterona - RP) são proteínas nucleares responsáveis pela mediação dos efeitos do estrógeno e da progesterona no epitélio mamário. Além de representarem um fator preditivo à resposta terapêutica, sua expressão tem correlação com o curso clínico dos carcinomas da mama. A presença de RE e RP é um excelente marcador de diferenciação dos carcinomas mamários.

Existem vários métodos para detecção e quantificação dos receptores hormonais. Os métodos bioquímicos (dextran-carvão) foram os primeiros introduzidos na prática e foram, durante muito tempo, os únicos disponíveis para detecção dos receptores. Entretanto, existem algumas desvantagens na utilização destes métodos, tais como: a necessidade de se obter grandes quantidades de tecido mamário a fresco (o que limita o seu uso em citologia aspirativa e biópsias por agulha), os falso-negativos e positivos (ausência de um controle morfológico), os custos e o tempo de execução da técnica ^(2,3). Embora ainda considerado como um método "standard" para análise de receptores hormonais, com o desenvolvimento de bons anticorpos monoclonais anti-RE e anti-RP, os métodos bioquímicos vêm sendo progressivamente substituídos pelas técnicas imuno-histoquímicas. Estas técnicas permitem observar o sítio específico do receptor nas células neoplásicas, distinguir atividade de RE e RP das células neoplásicas da sua presença no epitélio mamário benigno vizinho à neoplasia e determinar a presença dos receptores mesmo em casos em que o material disponível para análise é pequeno, como por exemplo em citologia aspirativa ⁽³⁾. Vários estudos comparativos mostram uma significativa correlação entre os métodos bioquímicos e os imuno-histoquímicos na determinação dos receptores ⁽⁴⁻⁶⁾. Além disto, alguns autores mostram que em casos discordantes a imuno-histoquímica reflete mais precisamente o status hormonal das células malignas do que a determinação bioquímica ⁽⁶⁾. Do ponto de vista clínico, Molino et al. ⁽⁷⁾ demonstraram que tanto a determinação dos RE por métodos bioquímicos como por imuno-histoquímicos tem o mesmo impacto prognóstico. Por todas estas razões, acreditamos que os métodos imuno-histoquímicos substituem, com vantagens, a determinação bioquímica dos receptores hormonais.

Anticorpos e técnicas imuno-histoquímicas de detecção

Os primeiros anticorpos utilizados na prática para a detecção imuno-histoquímica dos receptores (H222 para RE) foram desenvolvidos para o uso em material congelado. Entretanto, a necessidade deste tipo de material cria algumas dificuldades de preservação antigênica bem como todos sabemos das dificuldades práticas em se obter material à fresco em todas as cirurgias de carcinoma da mama.

Do ponto de vista do patologista cirúrgico o método imuno-histoquímico ideal é aquele que pode ser feito em material fixado e incluído em parafina. Em 1992, comprovamos ser possível, utilizando o anticorpo monoclonal H222, determinar a presença de receptores de estrogênio em material fixado em formalina e incluído em parafina ⁽²⁾. Para tal, introduzimos algumas modificações na técnica original: aumento do tempo de tripsinização (120 minutos), incubação do anticorpo primário durante toda a noite e introdução do método da avidina-biotina-peroxidase ao invés do PAP.

Posteriormente, muitos outros clones foram desenvolvidos para permitir uma detecção sensível e específica dos receptores em material de rotina. Em nossa experiência, os clones ER1D5 (RE) e 1A6 (RP) são aqueles que ao lado de fornecerem bons resultados, melhor são padronizados na rotina de um laboratório de imuno-histoquímica. Estes anticorpos mostram uma clara e inequívoca coloração nuclear em material fixado em formalina e incluído em parafina. Recentemente introduzimos na nossa rotina a pesquisa de RE com o anticorpo monoclonal 6F11. Nossos resultados tem confirmado achados da literatura ⁽⁸⁾, demonstrando que este anticorpo é mais estável e fornece coloração de melhor qualidade que o 1D5. Em ambos, utilizamos métodos de recuperação antigênica com microondas (15 minutos - 650 W em tampão citrato) e

revelação com avidina-biotina-peroxidase (ABC). Alguns autores têm descrito melhores resultados com streptavidina-biotina-peroxidase, entretanto em nossa experiência não verificamos diferenças substanciais e continuamos a usar o método do ABC. A utilização de métodos de amplificação, tais como o sistema da catalisação pela biotilil-tiramida (CSA/CARD) descritos no capítulo 21, tem tido grandes vantagens em termos de hibridização in situ, mas em termos de detecção de receptores não se justifica o seu uso de rotina ⁽⁹⁾. Em nosso laboratório, utilizamos a diluição de 1/200 para o ER1D5 e 1/60 para o 6F11 e 1/40 para o RP (1A6). Em material de citologia aspirativa, previamente fixado em álcool 95 e corado pelo Papanicolaou, também é possível a detecção de receptores ⁽³⁾. Após a retirada da lamínula e sem necessidade de usar procedimentos de descoloração do esfregaço, aplicamos a técnica imuno-histoquímica habitual com o uso do forno de microondas para recuperação antigênica. Em nossa experiência, há uma forte correlação entre a determinação de RE nos esfregaços com àquela utilizada em material congelado e em material fixado em formalina e incluído em parafina ⁽³⁾.

Interpretação, uso de quantificação e controles

A positividade para RE e RP é considerada apenas quando observamos coloração nuclear. Embora a coloração citoplasmática seja rara para RE, em nossa experiência ela aparece com maior freqüência para RP, inclusive às vezes com padrão citoplasmático. De qualquer forma, só consideramos o caso como positivo quando vemos coloração nuclear.

O uso de métodos de quantificação dos receptores em cortes histológicos e esfregaços citológicos é bastante discutido na literatura e freqüentemente tem sido posta em causa. Parece que, mesmo a utilização de métodos de análise de imagem, ainda não tem tido a padronização e o tempo suficiente para termos uma idéia precisa do seu uso clínico. Nossa experiência pessoal e de alguns autores ^(4,6,7) tem mostrado uma boa correlação entre a quantificação imuno-histoquímica dos receptores e os seus níveis determinados por técnicas bioquímicas.

O nosso laboratório utiliza o sistema proposto por Sannino e Shousha ⁽⁴⁾ que leva em conta a intensidade e extensão de coloração. Neste sistema, a intensidade de coloração é dividida em moderada (score 1) e forte (score 2) e a porcentagem de células tumorais coradas em ocasionais, até 1/3 (score 1), até 2/3 (score 2) e mais que 2/3 (score 3) de células tumorais positivas. O caso é classificado como: negativo quando não se observam células tumorais coradas; positivo + indicando a presença de células ocasionais positivas; positivo ++ indicando casos com até 1/3 de células coradas de moderada intensidade (score 1= 1X1); positivo +++ indicando até 2/3 de células coradas de moderada ou forte intensidade ou até 1/3 de forte intensidade ou ainda moderada intensidade em mais que 2/3 (score 2 a 4= 2X1, ou 2X2 ou 3X1); positivo ++++ indicando coloração de forte intensidade em mais de 2/3 (score 6= 3X2). Este método, embora com toda a limitação de se quantificar intensidade de coloração de modo subjetivo e de se avaliar extensão em um corte histológico do tumor, tem mostrado que praticamente todos os casos considerados negativos ou positivos + são negativos do ponto de vista bioquímico (menos de 10 fmol/mg) enquanto 80% dos casos positivos +++ e praticamente todos positivos ++++ são positivos do ponto de vista bioquímico. Os casos positivos ++ são aqueles de maior discordância, mas não são freqüentes em nossa experiência ⁽³⁾.

Em relação ao uso de controles, preferimos utilizar como controles positivos, casos de carcinoma da mama positivos para RE e RP que tenham tido uma boa e controlada fixação e inclusão. Lembramos que o uso de tumores mamários benignos e outros tumores como leiomiomas uterinos também podem ser utilizados como controles desde que a presença de receptores tenha também sido previamente confirmada. Em nossa experiência, embora o uso do tecido mamário benigno ou normal adjacente ao tumor possa representar uma economia no uso dos anticorpos, não deve ser utilizado como controle positivo. Em estudo recente em nosso laboratório, verificamos que em até cerca de 10% dos casos o tecido mamário adjacente a tumores positivos para RE e RP era negativo para estes marcadores ⁽¹⁰⁾.

Problemas mais freqüentes

Em nossa prática de imuno-histoquímica os problemas mais freqüentes encontrados com os receptores são os seguintes:

a. Descolamento dos cortes no microondas. O uso de lâminas com silano ou mesmo com gelatina diminui bastante o descolamento. Além disto, o uso de soluções "retrieval" padrões, em panela de pressão ou em "banhos-maria" a 100° C também produzem muito menos descolamento do que o microondas.

b. Coloração citoplasmática para os RP. Conforme mencionamos anteriormente, por vezes observamos coloração citoplasmática e até mesmo membrana com o clone 1A6. Embora a padronização da diluição possa diminuir este tipo de reação, às vezes ele persiste. Nestas situações só valorizamos quando há coloração nuclear, caso contrário consideramos negativo.

c. Ausência de coloração em casos positivos (falsos-negativos). Um dos problemas mais freqüentes relacionados a falsos-negativos deve-se a alteração do pH da solução tampão. Não esquecer que em imuno-histoquímica a manutenção do pH é essencial para uma reação adequada. Outra causa é a perda de reatividade do anticorpo. Temos observado que o clone 1D5 para RE perde reatividade mais rapidamente que o clone 6F11 e mesmo que o 1A6 para RP. Também a demora na fixação da peça (peças que ficam a fresco mais do que 1 h e depois são fixadas, tendem a mostrar fraca reatividade para RE) ou fixação inadequada são problemas observados, especialmente nos laboratórios que recebem casos em consulta.

Aplicações Clínicas

A determinação de RE e RP por imuno-histoquímica tem valor prognóstico ⁽¹¹⁾ e preditivo a terapêutica. O valor prognóstico é de maior impacto em casos com axila positiva. Cerca de 70 a 80% dos tumores RE e RP positivos respondem ao tratamento, enquanto nos restantes 20 a 30% tal não acontece. A determinação dos receptores também é de grande importância na resposta terapêutica em carcinomas recidivantes. Se possível, todo carcinoma mamário recidivante deveria ser analisado para pesquisa de receptores desde que há uma variação entre o tumor primário e suas metástases de até 25% dos casos. Recentemente, Kuukasjarvi et al. ⁽¹²⁾, mostraram que a perda de RE em recidivas está associada a pior resposta a terapêutica endócrina. Desde que a expressão de RP é induzida por RE a maioria dos tumores RP positivos é também positiva para RE. Embora saibamos que raros tumores possam ser RP positivos e RE negativos por imuno-

histoquímica, sempre que isto ocorrer devemos verificar a reatividade do nosso anticorpo para RE. Casos RE e RP positivos mostram melhor resposta a terapia endócrina do que casos somente RE positivos e Silvestrini et al. ⁽¹³⁾ mostraram que casos RP negativos e p53 positivos, independentemente do RE, são de grande risco para recidiva local.

Mulheres na pós-menopausa têm carcinomas mais freqüentemente RE e RP positivos do que mulheres na pré-menopausa. Embora não substituam a determinação dos receptores, em estudo prévio demonstramos que carcinomas ductais bem diferenciados, carcinomas lobulares, mucinosos, sem necrose, com discreto ou ausente infiltrado linfocítico e com acentuada elastose são quase sempre receptores positivos ⁽²⁾.

2. Marcadores de Proliferação Celular

O capítulo 17 discute, em detalhes, os principais marcadores de proliferação celular.

Aplicações clínicas

Não há dúvida de que a determinação do índice proliferativo dos carcinomas da mama pelo MIB-1 tem um grande impacto prognóstico ⁽¹¹⁾. Além da correlação com vários fatores adversos tais como tamanho do tumor, grau histológico, negatividade para receptores, aneuploidia e expressão do p53 (15), tem também sido demonstrado que carcinomas da mama com elevados índices proliferativos apresentam maiores taxas de recidiva, menor sobrevida e período livre de doença ^(13,19-21). Nenhum dos marcadores de proliferação estudados se correlaciona com a presença de metástases axilares, provavelmente porque a cinética celular e a capacidade metastática sejam propriedades distintas da célula tumoral.

A utilização do índice proliferativo como um fator preditivo a resposta quimioterápica tem sido estudada com muito interesse, com resultados iniciais promissores. Estes dados estimulam o estudo do índice proliferativo em material de citologia aspirativa em casos submetidos a quimioterapia neoadjuvante ⁽¹⁶⁾.

3. Produto do oncogene c-erbB-2

Introdução

O protooncogene c-erbB-2 está localizado no cromossoma 17 e codifica uma proteína receptora transmembranar de 185KDa semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico. É o análogo humano do gene transformador neu originalmente encontrado em linhas celulares de neuroblastoma de rato derivadas de tumores induzidos por etilnitrosuréia. A expressão excessiva ("overexpression") do produto do oncogene c-erbB-2 em células NIH/3T3 em cultura induz transformação maligna.

Desde a descrição original de Slamon et al. em 1987 ⁽²²⁾ mostrando a existência de uma correlação entre amplificação do c-erbB-2 e agressividade biológica nos carcinomas mamários, foram descritos numerosos artigos na literatura acerca do valor prognóstico deste oncogene em vários tipos de neoplasia. Expresso em cerca de 10 a 20% dos casos de carcinoma da mama, o c-erbB2 tem correlação com a sobrevida, especialmente em pacientes com metástases axilares. Demonstrou-se também que os carcinomas c-erbB-2

positivos disseminam-se sistemicamente com maior precocidade, especialmente para o fígado ⁽¹¹⁾. Em nossa experiência a expressão do c-erbB-2 também correlaciona-se com fatores de agressividade, como por exemplo a aneuploidia ⁽²³⁾. Em relação aos casos "axila-negativos", o valor prognóstico do c-erbB2 é ainda muito controverso.

Recentemente, foi demonstrado que o c-erbB2 está envolvido na motilidade das células mamárias e que pode atuar como um fator promotor da motilidade ⁽²⁴⁾. Estes achados, determinados a partir de casos de Doença de Paget e experimentalmente, vem sendo confirmados através da observação de que carcinomas invasores com extenso componente intraductal ⁽²³⁾, assim como carcinomas intraductais com maior extensão tem mais freqüentemente expressão de c-erbB-2 ⁽²⁴⁾. Estes achados têm importante significado clínico na determinação de recidivas em cirurgias conservadoras.

A determinação da expressão de c-erbB-2 por imuno-histoquímica apresenta uma grande vantagem sobre o estudo de produtos de outros genes, já que na quase totalidade dos casos a presença de uma coloração de membrana para o produto do c-erbB-2 está associada a real amplificação do gene, como demonstrado por técnicas de biologia molecular.

Anticorpos e técnicas imuno-histoquímicas de detecção

Existem vários anticorpos que detectam o produto do oncogene c-erbB-2. Em nosso laboratório temos experiência com dois deles: o monoclonal NCL-CB11 e o policlonal A 485. O primeiro reconhece um domínio interno da oncoproteína e é o que melhor se correlaciona com a amplificação do oncogene. A diluição utilizada para este anticorpo em nosso laboratório é de 1/40, com incubação durante toda a noite e sem tratamento enzimático prévio ou qualquer método de recuperação antigênica. Em relação ao policlonal A 485, fazemos recuperação antigênica com microondas, incubação durante toda a noite e diluição de 1/200. Este anticorpo reconhece um epítipo citoplasmático. A técnica de detecção, como nos casos anteriores é o ABC. O c-erbB-2 também pode ser detectado em material de citologia previamente corado e fixado.

Interpretação, uso de quantificação e controles

Com a utilização do anticorpo NCL-CB11 somente temos encontrado positividade de membranas e só a esta consideramos como positivo. Alguns autores descrevem positividade citoplasmática para c-erbB2 em carcinomas da mama, inclusive com valor prognóstico ⁽²⁵⁾, entretanto não temos observado este tipo de coloração em nossos casos e, portanto, consideramos apenas a coloração de membrana, com a qual temos encontrado correlação com fatores de agressividade biológica em carcinomas invasores ⁽²³⁾ e in situ ⁽²⁶⁾.

Não quantificamos o c-erbB-2 e utilizamos como controles positivos, casos de adenocarcinomas (estômago e mama) com amplificação demonstrada por métodos de biologia molecular e que tenham tido uma boa e controlada fixação e inclusão.

Aplicações clínicas

Não há dúvida de que em carcinomas invasores, especialmente aqueles com axila positiva, a expressão do c-erbB-2 está relacionada a um comportamento biológico mais agressivo e com metastatização sistêmica precoce, especialmente para o fígado ⁽¹¹⁾. A demonstração que a expressão do c-erbB-2 está relacionada à extensão dos carcinomas in situ (61% dos tumores maiores que 2 cm são positivos, enquanto somente 10% dos tumores menores que 1 cm são positivos) e que carcinomas invasores com extenso componente intraductal são mais freqüentemente positivos que os carcinomas invasores apoiam o papel do c-erbB-2 na motilidade das células neoplásicas no interior dos ductos mamários ^(23,24). Na verdade, tem sido mostrado que carcinomas mamários positivos para c-erbB-2 apresentam recidiva local com maior freqüência que os negativos (56% vs. 10%) em casos com 10 anos de follow-up ⁽²⁷⁾. Recentemente, Molina et al. demonstraram que os níveis séricos de c-erbB-2 também estão relacionados a recidiva loco-regional ⁽²⁸⁾.

O recente desenvolvimento de terapêuticas farmacológicas baseadas no uso de anticorpos monoclonais contra o c-erbB-2 torna ainda mais importante a determinação sistemática do c-erbB-2 em casos de câncer de mama.

4. Produto do gene supressor tumoral p53

Introdução

O p53 é um gene localizado no cromossoma 17, que codifica uma fosfoproteína nuclear de 53KDa, que atua na proliferação celular regulando a transcrição do DNA. Ao parar o ciclo celular em G1 a proteína do p53 permite que os mecanismos de reparação atuem sobre os erros espontâneos ou induzidos no DNA. Se estes mecanismos falharem o p53 pode acionar eventos apoptóticos levando a destruição da célula danificada. A inativação funcional do p53, seja por mutação ou por deleção, representa uma das anormalidades genéticas mais freqüentemente encontradas em neoplasias humanas. Nas células normais a proteína p53 do tipo selvagem têm curta meia-vida e não se acumula em níveis detectáveis. As mutações levam à produção de proteínas de conformação alterada que, por terem maior meia-vida, se acumulam nas células neoplásicas e podem ser detectadas por imuno-histoquímica ⁽¹¹⁾. O efeito regulador negativo do p53 sobre a proliferação celular parece ser inativado pelas mutações, o que confere vantagem proliferativa a estas células.

Em 1982, Crawford et al. ⁽²⁹⁾ demonstraram a expressão de p53 em 9% dos carcinomas mamários e associaram esta expressão a presença de metástases à distância. Desde então, centenas de artigos têm sido publicados sobre o valor da determinação do p53 no prognóstico em carcinomas da mama. A taxa média de expressão é de 35% e vários métodos são utilizados para sua detecção, desde métodos moleculares até imuno-histoquímica. A maior parte das séries mostra correlação entre expressão do p53 e grau histológico, índice proliferativo elevado e negatividade para receptores ⁽¹¹⁾. Da mesma forma que para o c-erbB2, as associações entre pior sobrevida e menor período livre de doença é bem demonstrada nos casos de carcinoma com metástases axilares, sendo o valor em casos axila negativos bastante controverso ⁽¹¹⁾.

É importante realçar que, ao contrário do c-erbB-2, a positividade imuno-histoquímica para p53 nem sempre corresponde a alterações do gene, como por exemplo, mutações. Este fato é bastante relevante, desde que em algumas séries a

análise das mutações tem maior valor prognóstico que a determinação imuno-histoquímica⁽³⁰⁾. Devemos também lembrar que a proteína do p53 pode ser estabilizada por interação com outros fatores (mdm2, proteínas do HPV) e acumular-se nas células mesmo na ausência de mutações.

Anticorpos e técnicas imuno-histoquímicas de detecção

Existem vários anticorpos que detectam o produto do gene p53. Em nosso laboratório temos experiência com dois monoclonais: DO7 e PAb1801⁽³¹⁾. Estes anticorpos reconhecem tanto as formas selvagens como mutantes do p53. O PAb 1801 reage com um epítipo entre os aminoácidos 32 e 79 enquanto o DO7 reage com um epítipo entre os aminoácidos 1 e 45. A diluição que utilizamos é de 1/40 para o PAb 1801 e de 1/50 para o DO7, com incubação durante toda a noite e com métodos de recuperação antigênica idênticos aos citados para os receptores (microondas - 15 minutos - 650 W em tampão citrato) e revelação com o método ABC. Em nossa experiência o anticorpo DO7 funciona melhor em material de rotina que o PAb 1801, que funciona melhor em congelação. Entretanto, a positividade para o PAb 1801 tem melhor correlação com a presença de mutações. O p53 também pode ser detectado em material de citologia previamente corado e fixado.

Interpretação, uso de quantificação e controles

Só consideramos como positivos casos com coloração nuclear. Da mesma forma que para o c-erbB2, coloração citoplasmática tem sido descrita por alguns autores⁽³²⁾, entretanto não temos observado este tipo de coloração em nossos casos e, portanto, consideramos apenas a coloração nuclear como positiva.

Vários estudos demonstraram que a detecção de mutações para o p53 tem um maior valor prognóstico e, mesmo, preditivo à terapêutica do que a imuno-histoquímica. Porém, na maioria dos casos, a presença de mutações está associada a forte coloração imuno-histoquímica^(30,33). Recentemente nosso grupo estudou uma série de carcinomas mamários e comparou a positividade imuno-histoquímica para o p53 com o anticorpo monoclonal DO7 e a pesquisa de mutações pelo método SSCP-PCR. Neste estudo, quantificamos o p53 com um sistema idêntico ao descrito anteriormente para os receptores hormonais, descrito por Sannino e Shousha⁽⁴⁾. Verificamos que todos os casos positivos ++++ e 70% dos positivos +++ apresentavam mutações, enquanto os casos com células ocasionais positivas e positivos + quase sempre eram negativos para mutações. Portanto, atualmente em nosso laboratório quantificamos a positividade imuno-histoquímica do p53, segundo um score que leva em conta intensidade e extensão de coloração.

Utilizamos, como controles positivos, casos de adenocarcinomas (estômago e mama) com mutação demonstrada por métodos de biologia molecular e que tenham tido uma boa e controlada fixação e inclusão.

Aplicações clínicas

Os numerosos estudos feitos com diferentes séries de carcinomas da mama utilizando diferentes metodologias, diferentes anticorpos, têm mostrado resultados controversos acerca do papel do p53 na determinação prognóstica dos carcinomas da mama. Não se tem dúvida de que a expressão do p53 associa-se a fatores adversos e que a expressão conjunta p53 e c-erbB2 pode identificar um grupo de carcinomas mamários com fenótipo bastante agressivo⁽³⁴⁾. Apesar do valor encontrado em casos com metástases axilares, vários estudos têm sido publicados acerca do valor do p53 em casos sem metástases axilares. Embora grande parte destes estudos não tenham demonstrado valor prognóstico nesta situação, é de realçar a série de Allred et al.⁽³⁵⁾ que compreende 700 pacientes com carcinoma da mama axila negativa e em que a expressão do p53 associou-se a recidiva e morte.

Provavelmente, a grande utilização do p53 nos próximos anos será devido ao seu valor como preditivo à resposta radio e quimioterápica. Mutações específicas do p53 parecem estar associadas a maior resistência a determinados agentes quimioterápicos⁽³³⁾. Além disto, a expressão do MDR 1 (multidrug resistance gene) está associada a mutações no p53. O p53 também pode modular a atividade transcricional da p-glicoproteína, cuja expressão excessiva ("overexpression") na membrana celular causa resistência a drogas. Enquanto a proteína p53 selvagem reprime a expressão da p-glicoproteína, as formas mutantes aumentam a sua atividade⁽¹¹⁾.

5. Marcadores de angiogênese

Introdução

Em 1991, Weidner et al. (36) demonstraram que a quantificação de vasos neoformados na periferia dos carcinomas mamários, utilizando marcação imuno-histoquímica para o antígeno relacionado ao fator VIII (FVIII), poderia ser um fator independente na previsão de metástases à distância. O crescimento tumoral e a angiogênese são fenômenos interrelacionados: após o tumor alcançar alguns milímetros de diâmetro, necessita induzir neoformação vascular para continuar sua progressão. Portanto, as mesmas alterações que permitem a célula formar grandes tumores, também devem induzir direta (fatores angiogênicos produzidos pela célula neoplásica) ou indiretamente (fatores produzidas pelas células hospedeiras) a angiogênese. Angiogênese é por si só um processo invasivo, pois implica na degradação de membranas basais e migração de células neoformadas (capilares) no interior de tecidos sólidos. Não é surpreendente, portanto, que seja um processo que facilita a invasão direta das células tumorais.

Atualmente, a avaliação da angiogênese é considerada como um dos fatores de prognóstico promissores em carcinoma da mama, entretanto os resultados obtidos em diferentes séries têm sido algo controversos, muito provavelmente pelas dificuldades de reprodutibilidade na quantificação dos vasos neoformados.

Anticorpos e técnicas imuno-histoquímicas de detecção

Três anticorpos são mais comumente utilizadas para identificar os microvasos a serem quantificados: FVIII, CD 31 e CD 34. Em nosso laboratório, temos utilizado o

anticorpo monoclonal anti-FVIII para avaliar os índices de angiogênese. Este marcador foi utilizado nos trabalhos originais ⁽³⁶⁾ e, posteriormente, considerado menos efetivo que o CD 31 e CD 34 para identificação dos vasos. Entretanto em dois estudos independentes recentes foi demonstrado que o CD 31 era o anticorpo com menor performance para este fim e que o melhor era o CD 34 ^(37,38), tendo o FVIII uma performance aceitável e com significado prognóstico ⁽³⁸⁾. O FVIII em nossa experiência tem nos dado resultados muito bons e continua sendo em nosso laboratório o anticorpo de eleição para avaliar angiogênese ⁽³⁹⁾. Utilizamos estes anticorpos nas seguintes diluições: FVIII - 1/60; CD 31 - 1/10 e CD 34 - 1/20. Fazemos tratamento proteolítico para o FVIII e o CD 34 e não fazemos qualquer tratamento prévio para o CD 31. As incubações são durante toda a noite e a técnica é o ABC.

Interpretação, uso de quantificação e controles

Um dos maiores problemas na determinação do índice de angiogênese é a metodologia na interpretação e quantificação destas reações. Em nossa prática, utilizamos os critérios mais freqüentemente usados na literatura: qualquer coloração positiva de células isoladas ou grupos de células claramente separadas de grupos adjacentes, com ou sem lumen, são considerados como um vaso individual. Posteriormente, identificamos a área com maior número de microvasos através de um screening do corte histológico em pequeno aumento ("hot spots"). A partir desta área, contamos os vasos em três campos adjacentes de 200 X (o que corresponde a cerca de 0.74 mm²). O primeiro campo a ser contado é aquele identificado no pequeno aumento como de maior vascularização ⁽³⁶⁻³⁹⁾. Tanto na nossa experiência ⁽³⁹⁾, como na de outros autores ⁽³⁷⁾ não há diferença estatística significativa entre o índice determinado pelo campo de maior número de microvasos como àquele determinado pela contagem média dos três campos. Entretanto, Martim et al. ⁽³⁸⁾ demonstram que esta abordagem pode ser diferente de acordo com o anticorpo utilizado. Usando o CD34, demonstraram melhor associação de angiogênese e sobrevida tanto usando o campo de maior contagem como a média, enquanto para o CD31 somente quando se usava o campo de maior número de vasos é que se verificava associações. Na nossa prática com o FVIII, utilizamos a média da contagem dos três campos ⁽³⁹⁾. Talvez seja na área da determinação da angiogênese que os métodos de imagem tenham sua maior utilização, na identificação dos "hot spots" com maior objetividade ⁽⁴⁰⁾. Outro problema relativo à quantificação em angiogênese diz respeito aos cut-offs que, na literatura, são bastante variáveis. Da mesma forma que para outros marcadores, por enquanto não há consenso sobre o "melhor cut-off" para angiogênese. Cerca de 80 a 100 microvasos/mm² quando se utiliza o FVII como marcador parece ser o cut-off mais consensual em dividir os casos com baixo e alto índice angiogênico ⁽³⁸⁾.

O controle positivo para estes marcadores é o endotélio dos vasos presentes na amostra.

Aplicações clínicas

A determinação do índice de angiogênese parece ser um fator prognóstico promissor em carcinomas da mama de modo a identificar casos com elevado potencial de metastatização à distância. Entretanto, provavelmente devido a problemas metodológicos, resultados controversos têm surgido na literatura. Em nossa experiência,

o índice angiogênico está relacionado com a idade, tendo as pacientes jovens níveis de angiogênese significativamente maiores ⁽³⁹⁾. Se este achado está relacionado ao fato de que câncer de mama em mulheres jovens tem maior índice de recidiva e pior prognóstico ainda está por se determinar. Como alguns estudos apontam que o índice de angiogênese é um fator prognóstico independente de disseminação metastática, em nossa opinião vale a pena tentar sistematizar sua análise em grupos selecionados de carcinomas da mama, embora até o momento não tenhamos incluído esta determinação como rotina em todos nossos casos.

6. Fatores de Crescimento e seus Receptores

Os principais fatores de crescimento envolvidos no câncer da mama são: fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β), fatores de crescimento de tipo "insulina-like", fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), entre outros. Como as células neoplásicas expressam o receptor e o ligando para vários destes fatores tem sido sugerido que uma alça autócrina possa ser um importante mecanismos de regulação do crescimento destas células in vivo. Além disto, muitos destes fatores podem atuar no estroma e estão envolvidos com a angiogênese. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a expressão do TGF- α está relacionado com o índice de angiogênese (dados não publicados). O TGF- α exerce seu efeito através do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), é mitogênico e sua síntese é regulada pelos estrogênios. Há evidências clínicas que as drogas anti-estrogênicas podem modular a expressão do TGF- α diminuindo sua expressão ⁽¹¹⁾. Em nossa experiência o TGF- α pode ser demonstrado por imuno-histoquímica, tanto nas células neoplásicas como no estroma, através do uso de anticorpos monoclonais. O TGF- β , tem efeito inibitório ao crescimento celular e estimula a síntese das metaloproteinases TIMP1 e TIMP2, responsáveis pela inibição tecidual do ativador de plasminogênio tipo uroquinase e da collagenase tipo IV. Os anti-estrogênicos são capazes de estimular a síntese de TGF- β o que poderia explicar a melhor sobrevida após tratamento com tamoxifen em pacientes pós-menopáusicas com axila positiva e receptoras de estrógeno negativas. Além disto, baixos níveis de TGF- β estão associados com menor intervalo livre de doença em pacientes com carcinoma da mama ⁽¹¹⁾. O EGFR é expresso em proporção inversa ao RE e está relacionado com alto grau histológico e elevada taxa proliferativa. Atualmente também pode ser demonstrado em material de rotina através do uso de técnicas imuno-histoquímicas com anticorpos monoclonais anti-EGFR. Este marcador parece ser útil na definição de subgrupos de risco: paciente RE negativos e EGFR positivos tem pior prognóstico que aqueles que são RE e EGFR negativos. Em pacientes sem metástases axilares, com baixo grau histológico mas com EGFR positivo tem significativa redução do tempo livre de doença e da sobrevida média ⁽¹¹⁾.

Sialyl-Tn

Sialyl-Tn (STn) é um antígeno simples das mucinas que é freqüentemente expresso em neoplasias e cuja expressão está associada a comportamento biológico agressivo. A expressão deste marcador em carcinomas da mama está associada a presença de metástases axilares, negatividade para receptores, expressão de c-erbB2 e alto grau histológico ⁽⁴³⁾. Acreditamos tratar-se de um promissor marcador de prognóstico

e mesmo preditivo, desde que tem sido mostrado maior resistência a quimioterapia em casos STn positivos. Nós utilizamos em nossa rotina o anticorpo monoclonal STn a diluição de 1/8 sem métodos de recuperação antigênica. A coloração que observamos é citoplasmática e/ou de membrana e consideramos positivo quando mais de 5% das células estiverem coradas ⁽⁴³⁾. Uma das potenciais utilidades deste marcador é o de identificar casos de risco para metastatização axilar.

Outros marcadores

Existem dezenas de outros marcadores que podem ser identificados por imuno-histoquímica e que foram ou estão sendo estudados como marcadores de prognóstico em carcinoma da mama. Muitos deles já pertenceram à rotina da avaliação prognóstica, como, por exemplo, o antígeno carcinoembrionário, catepsina e a vimentina. Este último pode ser usado conjuntamente com um painel básico, especialmente em laboratórios que recebem casos em consulta, pois representam um bom marcador da qualidade de fixação dos tecidos. Embora alguns estudos tenham demonstrado que a expressão de vimentina estava associada a pior prognóstico, outros estudos falham em confirmar esta hipótese ⁽⁴⁴⁾. Recentemente, outros marcadores vêm sendo estudados e adicionados a lista dos potenciais marcadores de prognóstico, como por exemplo: o produto do gene anti-metastatizante nm23, as proteínas envolvidas no controle da apoptose: bcl-2 e bax, as metalotioninas, os receptores de laminina, as moléculas envolvidas na adesão celular como a cadherina e o CD 44, o pS2, p-glicoproteína e as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular: ciclinas, p21 e p27 e muitos outros. Vale a pena realçar os resultados promissores obtidos com a determinação imuno-histoquímica do p27 ⁽⁴⁵⁾. O p27 é um inibidor kinase-dependente das ciclinas e sua perda ou diminuição está associada a um descontrole do ciclo celular. Recentemente, foi demonstrado que baixos níveis de p27 determinados por imuno-histoquímica estão associados com significativa redução do período livre de doença em pacientes com carcinoma da mama ⁽⁴⁵⁾.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além dos marcadores de prognóstico enumerados neste capítulo, muitos outros têm sido estudados. Não existe, no entanto, qualquer marcador isolado que possa prever com exatidão o comportamento de um tumor em uma paciente em particular. No caso do carcinoma da mama, os fatores de prognóstico determinados pelo exame anatomopatológico clássico, tais como: tamanho do tumor, tipo e grau histológico, invasão vascular e envolvimento axilar continuam sendo preponderantes. Entretanto, fatores determinados por imuno-histoquímica passam também a ser obrigatórios na avaliação de qualquer carcinoma mamário, tais como os receptores hormonais e os marcadores de proliferação, e outros (como por ex.: p53 e c-erbB2) também já o são em situações mais particulares. Estudos prospectivos muito provavelmente irão determinar, dentro deste grande número de marcadores, quais deverão ser incorporados em nossa rotina. A Tabela 2 mostra um resumo dos principais marcadores imuno-histoquímicos usados em nosso laboratório com estes objetivos.

Tabela 2 – Características dos principais marcadores utilizados para avaliação prognóstica dos carcinomas de mama

Marcador	Anticorpos	Diluição	Tratamento prévio	Quantificação	Utilização
RE	1D5 e 6F11	1/200 e 1/60	Microondas	sim	Rotina
RP	1A6	1/40	Microondas	sim	Rotina
Ki-67	MIB-1	1/200	Microondas	sim	Rotina
c-erb-B2	NCL-CB11	1/40	Não utilizado	não	Em alguns casos
	A 485	1/200	Microondas		
P53	PAB 1801	1/40	Microondas	sim	Em alguns casos
	DO7	1/50			
Angiogênese	Fator VIII	1/60	Enzimático	sim	Em investigação
	CD 31	1/10	Não utilizado		
	CD 34	1/20	Enzimático		
Sialyl Tn	STn	1/8	Não utilizado	não	Em investigação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schmitt FC, Kimaid PA, Campos PF, Bacchi CE. Contribuição do estudo imuno-histoquímico para o diagnóstico anatomopatológico. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 1992; 47: 1-5.
2. Schmitt FC, Andrade LM, De Lucca LA. Detection of estrogen receptor in formallin-fixed and paraffin-embedded breast carcinoma: correlation with histological patterns. *Rev. Paul. Med.* 1992; 110: 158-161.
3. Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn. Cytopathol.* 1995; 13: 347-351.
4. Sannino P, Shousha S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 90-92.
5. Kell DL, Kamel O, Rouse RV. Immunohistochemical analysis of breast carcinoma estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tissue. Correlation of clones ER1D5 and 1A6 with a cytosol-based hormone assay. *Appl. Immunohistochem.* 1993; 1: 275-281.
6. Alberts SR, Ingle JN, Roche PR, Cha SS, Wold LE, Farr GH, Krook JE, Wieand HS. Comparison of estrogen receptor determinations by a biochemical ligand-binding assay and immunohistochemical staining with monoclonal antibody ER1D5 in females with lymph node positive breast carcinoma entered on two prospective clinical trials. *Cancer* 1996; 78: 764-772.
7. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Corgnati A, Sperotto L, Recaldin E, Spagnoli P, Manfrin E, Bonetti A, Nortilli R, Tomezzoli A, Pollini GP, Modena S, Cetto GL. Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res. Treat.* 1997; 45: 241-249.
8. Bevitt DJ, Milton ID, Piggoy N, Henry L, Carter MJ, Toms GL, Lennard TWJ, Westley B, Angus B, Horne CHW. New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry. *J. Pathol.* 1997; 183: 228-232.
9. Schmitt FC, Soares R, Leitão D. Detection of numerical chromosome 17 abnormalities in fine needle aspirates of breast cancer using a novel in situ hybridization signal amplification method. *Diagn. Cytopathol.* (in press).
10. Pereira MB, Leitão D, Schmitt FC. Expressão de receptores de estrogénio e progesterona no tecido mamário normal coexistente com carcinomas. *Anais do Congresso Nacional de Técnicos de Anatomia Patológica, Porto, 1998.*
11. Schmitt FC. Prognóstico do cancro da mama: avaliação do impacto de novos métodos face aos factores prognósticos tradicionais. *Arq. Med. (Portugal)* 1994; 8: 319-324.
12. Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 2584-2589.
13. Silvestrini R, Benini E, Veneroni S, Daidone MG, Tomasic G, Squicciarini P, Salvadori B. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 1604-1610.
14. Camplejohn RS, Gilbert CE, Raikundalin B, Barnes DM, Gregory WM, Richards MA, Millis RR. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single center. *Br. J. Cancer* 1995; 71: 140-145.
15. Schmitt FC, Ferreira MP. MIB-1 is a suitable marker of proliferative activity in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of breast cancer. *Int. J. Surg. Pathol.* 1995; 2: 287-294.
16. Marinho A, Soares R, Amendoeira I, Schmitt FC. Detecção de receptores de estrogénio e progesterona e do índice de proliferação em citologia aspirativa de cancros da mama avançados. *Arq. Med. (Portugal)* 1997; 11: 19-23.

17. Schmitt FC, Rabenho RST SH, Maeda SA, Colturato V, Melo LN. Estimation of growth fraction in fine needle aspirates from non-Hodgkin's lymphomas using anti-PCNA/Cyclin: correlation with Kiel classification. *Acta Cytologica* 1996; 40: 199-204.
18. Schmitt FC, Pereira EM, Andrade LM, Torresan M, Delucca L. Proliferative activity in paraffin-embedded sections of breast carcinoma detected by monoclonal antibody PC 10 does not correlate with mitotic index and estrogen receptor immunoreactivity. *Path. Res. Pract.* 1994; 190: 786-791.
19. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubelo Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G, Cetto GL. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables. *Int. J. Cancer* 1997; 74: 433-437.
20. Railo M, Lundin J, Haglund C, Von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, ER-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol.* 1997; 36: 369-374.
21. Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K, Janicke F, Nathrath W, Schmitt M, Graeff H, Hofler H. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* 1997; 75: 1525-1533.
22. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
23. Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M. c-erbB-2 protein expression and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Arch. Path. Lab. Med.* 1995; 119: 815-820.
24. Schmitt FC. Comments on p53 protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast. *Eur. J. Cancer* 1997; 33: 1903.
25. Keshgegian A, Cnaan A. c-erbB-2 oncoprotein expression in breast carcinoma. Poor prognosis associated with high degree of cytoplasmic positivity using CB-11 antibody. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 108: 456-463.
26. Leal C, Schmitt FC, Bento MJ, Maia N, Lopes C. Ductal carcinoma in situ of the breast: histological categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53 and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995; 75: 2123-2131.
27. Haffty BG, Brown F, Carter D, Flynn S. Evaluation of HER-2 neu oncoprotein expression as a prognostic indicator of local recurrence in conservatively treated breast cancer: a case-control study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996; 35: 751-757.
28. Molina R, JO J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, Farrus B, Latre ML, Gimenez N, Hage M, Estape J, Ballesta AM. c-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2295-2300.
29. Crawford LV, PIM DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 1982; 30: 403-408.
30. Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, Bergh J. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88: 173-182.
31. Schmitt FC, Leal C, Lopes C. p53 protein expression and nuclear DNA content in breast intraductal proliferations. *J. Pathol.* 1995; 176: 233-241.
32. Stenmark-Askmalin M, Stal O, Olsen K, Nordenskjold B. p53 as a prognostic factor in stage I breast cancer. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Br. J. Cancer* 1995; 72: 715-719.
33. Aas T, Borrensens AL, Geisler S, Sorensen BS, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat. Med.* 1996; 2: 811- 814.
34. Han S, Yun IJ, Noh DY, Choe KJ, Song SY, Chi JG. Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. *J. Surg. Oncol.* 1997; 65: 22-27.
35. Allred DC, Clark GM, Elledge R et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85:200-206.

36. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl. J. Med.* 1991; 324: 1-8.
37. Siitonen SM, Haapasalo HK, Rantala IS, Helin HJ, Isola JJ. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod. Pathol.* 1995; 8: 745-752.
38. Martim L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br. J. Cancer* 1997; 76: 1046-1054.
39. Marinho A, Soares R, Ferro J, Lacerda M, Schmitt FC. Angiogenesis in breast cancer is related to age but not to other prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.* 1997; 193: 267-273.
40. Barbareschi M, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Dalla Palma P. Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995; 36: 181-192.
41. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol.* 1992; 31: 125-130.
42. Gorhing UJ, Scharla A, Thelen U, Ahr A, Crombach G, Titius BR. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer: comparison of immunohistochemical and immunoradiometric detection methods. *J. Clin. Pathol.* 1996; 49: 57-64.
43. Soares R, Marinho A, Schmitt FC. Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.* 1996; 192: 1181-1186.
44. Seshadri R, Raymond WA, Leong AS, Horsfall DJ, Mccauley K. Vimentin expression is not associated with poor prognosis in breast cancer. *Int. J. Cancer* 1996; 67: 353-356.
45. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat. Med.* 1997; 3: 227-230.

5. TUMORES UROLÓGICOS

Fernanda B. C. Cavalcante e Venâncio A.F. Alves

A aplicação da Imuno-histoquímica ao estudo das neoplasias Urológicas tem demonstrado grande utilidade na definição de entidades particulares de cada órgão, no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas e na avaliação de fatores prognósticos.

RIM

O carcinoma de células renais é um tumor de adultos (média de idade ao diagnóstico: 6ª e 7ª décadas), podendo acometer adultos jovens quando associado a esclerose tuberosa, Doença de von Hippel Lindau, doença cística adquirida ou doença policística do adulto.

Atualmente, o carcinoma de células renais é reconhecido como uma família de carcinomas derivados do epitélio tubular, mas que apresentam aspectos morfológicos distintos, resultantes de anormalidades genéticas diferentes ⁽¹⁾.

Marcadores ⁽²⁾

Os dois tipos mais frequentes de carcinoma de células renais, o clássico de "células claras" e o de "células cromófilas", apresentam coexpressão de vimentina e citoqueratinas (CK 8/18, 19 e 7), além da expressão do antígeno da membrana epitelial (EMA) ^(31,32).

O carcinoma de células cromóforas, por outro lado, costuma mostrar-se negativo para vimentina, fracamente positivo para CK19 e fortemente positivo para CK8/18 e 7 ^(32,33).

O oncocitoma é neoplasia benigna da córtex renal que não costuma expressar vimentina (exceto nas áreas centrais de regressão) e é particularmente rico na expressão da proteína CD 68 de lisossomas (também presente, em graus variáveis, nos outros carcinoma renais) ⁽³³⁾.

O carcinoma de ductos coletores ⁽³⁾ parece originar-se do néfron distal e apresenta características imuno-histoquímicas intermediárias entre o carcinoma de células renais e o carcinoma urotelial da pelve renal, coexpressando CK8/18 e 19 e vimentina, ao lado da expressão de antígenos dos grupos sanguíneos ABH, sendo, porém, negativo para CK13.

Os carcinomas uroteliais intrarrenais ou de pelve renal podem se apresentar com morfologia clássica, papilífera ou sólida, não sendo incomum no entanto sua apresentação "sarcomatóide" ⁽⁴⁾ que se assemelha ao fibro-histiocitoma maligno. Felizmente para nós, mesmo os que exibem esta última morfologia apresentam, pelo menos focalmente, áreas de displasia urotelial adjacente ou mesmo focos de aspecto morfológico mais clássico, daí a importância de uma boa representação de diferentes áreas tumorais e não tumorais. Nos casos onde a dúvida persiste, o perfil imuno-histoquímico pode auxiliar, pois essas neoplasias apresentam expressão de

citoqueratinas e antígeno da membrana epitelial (EMA), sendo negativas para vimentina e actinas.

Na diferenciação entre carcinoma urotelial e de células renais, além da não expressão de vimentina, a positividade para antígenos dos grupos sanguíneos ABH e citoqueratinas de epitélio tipo escamoso (5/14/17 e 13) bem como a citoqueratina 20 de epitélio de tipo ductal/ tubular, geralmente é suficiente para o diagnóstico.

O angiomiolipoma ⁽⁵⁾ é uma neoplasia composta por tecido adiposo, vasos sanguíneos e tecido muscular liso, que pode ser única ou múltipla (nesses casos, mais frequente na Esclerose Tuberosa), podendo coexistir com carcinoma de células renais e oncocitoma. Apresenta imunorreatividade peculiar com expressão de HMB-45 (presença de pré-melanossomas citoplasmáticos vistos à microscopia eletrônica, aspecto recentemente atribuído por Pea et al., 1998, a sua origem nas células epitelióides perivasculares (PEC) ⁽³⁴⁾). Esta neoplasia também exibe reatividade para vimentina e actina.

BEXIGA

O carcinoma de células transicionais representa cerca de 90% de todos os tumores primários desse órgão, podendo ser único, múltiplo, exofítico ou endofítico. Mais comumente visto em adultos de meia idade, pode acometer qualquer faixa etária, incluindo a pediátrica.

Marcadores

O epitélio transicional normal expressa positividade para CK 14 e 16 nas células da camada basal e CK 8 e 18 nas do glicocálix ("umbrella cells"). Algumas condições, como os ninhos de von Brunn, a metaplasia escamosa e a cistite glandular podem alterar a intensidade e distribuição desses antígenos ⁽⁶⁾.

Os carcinomas de células transicionais tendem a mostrar positividade difusa para esses 2 grupos de citoqueratinas, com diminuição da positividade da CK 18 nos de mais alto grau. Além desses dois grupos de citoqueratinas, como já foi dito nos carcinomas uroteliais de rim, essa neoplasia pode expressar CK 20 em graus variáveis ⁽⁷⁾. É conhecida sua reatividade para antígeno da membrana epitelial (EMA), CD15 ⁽⁸⁾ e CEA ⁽⁹⁾, bem como de Ag ABH ⁽⁷⁾.

Fatores prognósticos

Dentre todos os tumores Urológicos, os carcinomas de células transicionais são os que apresentam resultados mais constantes em relação a fatores prognósticos. Como esses marcadores já foram discutidos em outro capítulo, nos limitaremos a escrever sobre suas aplicações nos carcinomas uroteliais.

Em relação aos marcadores de proliferação celular, a expressão de PCNA e Ki67 ^(10,11) correlaciona-se com grau histológico mais elevado do tumor. A expressão de c-erb-B-2 ⁽¹²⁾ e p53 correlaciona-se com o grau dos tumores, sendo o primeiro também correlacionado com estágio e prognóstico.

A sobrevida dos pacientes com carcinoma de células transicionais está relacionado à integridade da membrana basal que, à imuno-histoquímica, pode ser estudada através da pesquisa de colágeno IV e laminina ⁽¹³⁾. Também pode ser pesquisada a expressão dos antígenos de histocompatibilidade (HLA I e II) ⁽¹⁴⁾.

A perda de antígenos de grupo sanguíneo correlaciona-se com maior probabilidade de tumores papilíferos invadirem a parede da bexiga ⁽¹⁵⁾.

O adenocarcinoma de bexiga compreende cerca de 1% dos tumores malignos desse órgão, apresentando 2 formas: os originários no úraco e os de bexiga propriamente dita. Esta classificação baseia-se na localização, dados clínicos e critérios morfológicos pois, sob o ponto de vista imuno-histoquímico, ambos exibem o mesmo perfil, com positividade para citoqueratinas, CEA, CD15 e antígeno da membrana epitelial (EMA) ⁽¹⁶⁾. Em particular, esses tumores podem expressar PSA e PAP, mesmo em mulheres, o que também ocorre com os adenomas de glândulas de Cowper ⁽²²⁾.

O carcinoma sarcomatóide urotelial, também é um tumor de faixa etária mais tardia, com apresentação clínica semelhante ao clássico carcinoma de células transicionais. Morfologicamente, consiste numa mistura de carcinoma com células fusiformes malignas e, eventualmente, até elementos heterólogos. Nesses casos, a imuno-histoquímica é fundamental para o diferencial com outras lesões fusocelulares puramente mesenquimais: pelo menos focalmente há positividade para CKs e/ou EMA. Mesmo que haja co-expressão com vimentina, esses casos devem ser classificados como carcinomas. Os elementos heterólogos exibem a positividade pertinente a cada tecido, sendo rara a expressão de actinas e virtualmente nula a de desmina (útil na diferenciação com leiomiossarcomas).

PRÓSTATA

O carcinoma de próstata tem tido um aumento na incidência ao longo das últimas décadas, sendo que, dentre os vários fatores que colaboraram com isso, está, certamente, a melhora na detecção precoce. Com isso, cada vez mais, o patologista depara-se com biópsias transretais que, devido à exiguidade de representação da lesão, oferecem dificuldades básicas na diferenciação entre proliferação de natureza benigna e maligna.

Nesse sentido, o conhecimento do padrão de reatividade das citoqueratinas desse órgão veio de encontro a essa necessidade pois a presença de células basais praticamente exclui a possibilidade de carcinoma, embora sua ausência não seja critério suficiente para o diagnóstico de malignidade. Nas neoplasias intraepiteliais (PIN), essa camada existe, embora possa ser descontínua. Morfologicamente no entanto, pode ser difícil a caracterização dessas células, sendo importante portanto sua visualização através de reação imuno-histoquímica.

Padrão normal de imunorreatividade ⁽¹⁷⁾

O perfil normal de positividade das células basais é de CK 5,10,11,13,16,14 e 19.

As células luminiais expressam CK 19,7,8 e 18, PSA e PAP.

Imunorreatividade das neoplasias

Os carcinomas prostáticos costumam expressar CK 8/18 e 19, e raramente 7. Como não apresentam camada de células basais, são negativos para as citoqueratinas de epitélio escamoso, que na nossa experiência pode ser pesquisada, com bons resultados, através do anticorpo monoclonal 34 β E12^(18, 19).

As células normais e neoplásicas produzem e secretam o PSA e o PAP (atualmente menos utilizada por ser menos específica), sendo notória a importância da dosagem sérica desses antígenos na detecção dos carcinomas de próstata. No tumor primário, no entanto, é de pouca importância a pesquisa desses antígenos, a não ser no diferencial com tumores de cólon ou do urotélio (embora nesses casos, algumas vezes também apresentem expressão de PSA e PAP) que estejam invadindo a próstata^(20, 22).

Vale lembrar que a positividade desses antígenos é variável de célula para célula, tendendo a ser menor nos tumores de mais alto grau (cerca de 1,6% dos carcinomas pouco diferenciados são negativos para PSA e PAP), sendo que os PINs tendem a ser menos positivos.

A grande indicação do PSA e PAP é na pesquisa de adenocarcinomas metastáticos com sítio primário indeterminado, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Deve-se ter em mente no entanto que outros tumores podem, focalmente e com menor intensidade, expressar esses antígenos. Destes tumores, os mais importantes são: adenoma pleomórfico e carcinomas de glândulas salivares, adenoma e adenocarcinomas de bexiga e de glândulas periuretrais^(21,22). O PAP também é expresso em neoplasias neuroendócrinas.

Expressão de receptores hormonais^(23, 24)

O receptor de andrógenos apresenta positividade no núcleo de células basais e luminais, no epitélio normal e nos carcinomas, responsivos ou não à androgenoterapia, não sendo preditivos quanto ao tempo de progressão da doença pós deprivação hormonal.

Marcadores prognósticos

A expressão de p53 é rara nos carcinomas de próstata, e essa mutação gênica, quando ocorre, é um evento tardio^(25, 29,27).

Outros marcadores, como o c-erb-B-2^(28,29,30), apresentam resultados controversos, não sendo comprovada ainda sua importância prognóstica como fator independente de outros parâmetros de estadiamento.

TESTÍCULO

Mais de 95% dos tumores testiculares são derivados das células germinativas. Essas neoplasias altamente malignas que costumam afetar homens jovens, atualmente são curáveis em uma grande proporção dos casos, o que torna importante o diagnóstico preciso dessas neoplasias. O esquema terapêutico é influenciável pelo tipo de tumor que é classicamente dividido em seminomatoso, não-seminomatoso e misto.

Marcadores dos tumores germinativos ⁽²⁶⁾

A positividade de membrana celular para a fosfatase alcalina placentária (PLAP) é o mais sensível marcador de diferenciação em célula germinativa e a expressão desse antígeno, na ausência do EMA parece ser um padrão único dos tumores germinativos.

Tanto CD45, como S-100 são negativos nesses tumores, o que é útil na diferenciação desses do linfoma e melanoma. Na distinção entre os seminomas e tumores não seminomatosos, a positividade difusa destes últimos para citoqueratinas é de grande valia. Ressalta-se, contudo, a positividade focal para citoqueratina em diversos casos de seminoma. Os tumores mistos exibem perfil semelhante de cada componente com o seu equivalente puro.

Marcadores de tumores individuais ⁽²⁶⁾

1. Neoplasia intratubular germinativa: A espermatogônia normal é negativa para a PLAP, sendo rara a positividade dos espermatócitos para esse antígeno. Como a morfologia da neoplasia intratubular germinativa dificilmente se confunde com o espermatócito normal, a positividade para esse antígeno é um marcador relativamente confiável desse tipo de lesão.

2. Seminoma: É o tipo mais comum de tumor germinativo puro, compreendendo cerca de 50% de todos os casos. Atinge uma faixa etária um pouco mais velha que os não seminomatosos (4ª, 5ª década de vida), apresentando uma morfologia muito característica.

O perfil clássico dos seminomas é a positividade de membrana citoplasmática, da PLAP. Há uma variável expressão de vimentina, CD15, α -1-antitripsina, desmina e neurofilamentos. As citoqueratinas são positivas focalmente em alguns casos, sendo o EMA negativo. Algumas células, com morfologia de sinciotrofoblasto, podem expressar β HCG, sendo, no entanto, necessária a presença de cito e sinciotrofoblasto para o diagnóstico de coriocarcinoma. O seminoma espermatocítico expressa PLAP focal e CK18 em "dot" para nuclear.

3. Carcinoma embrionário: embora muito comum nos tumores mistos, é raro como forma pura, em grande parte pelo reconhecimento de focos de tumor de saco vitelino, morfológica e imuno-histoquimicamente. Acomete uma faixa etária de 2ª, 3ª décadas, com morfologia variável, podendo ser semelhante ao seminoma, quando apresenta padrão sólido, ou ao tumor de saco vitelino quando apresenta padrão tubular.

O perfil imuno-histoquímico deste tumor caracteriza-se pela forte e difusa positividade para CK 8/18, 4/17, 19. A PLAP, pode ser positiva e apresenta-se, em geral, mais focal e menos intensa do que nos seminomas. Observa-se uma expressão variável de α -fetoproteína (especialmente nos tumores mistos), α -1-antitripsina, CD15 e vimentina. De particular, o carcinoma embrionário pode ser positivo para antígeno Ki-1 (CD30), sendo negativo para o EMA.

4. Tumor do saco vitelino ou seio endodérmico: é o tumor mais freqüente em crianças pré-puberais, geralmente sob a forma pura. Nos adultos é, geralmente, associado a outros tipos de tumores. A α -fetoproteína é o grande marcador desse tipo de tumor, sendo mais expressa nos adultos, especialmente em áreas hepatóides. Cerca de 50%

dessa neoplasia apresenta positividade para α -1-antitripsina, CEA, CKs, vimentina e PLAP.

5. Teratoma: É o 2º tumor mais comum em crianças, sendo raro acima dos 4 anos.

A PLAP é expresso em alguns elementos glandulares desse tumor. Os outros tecidos exibem imuno-expressão dos antígenos esperados para cada tipo de linhagem celular (Ex: GFAP em tecido glial).

6. Coriocarcinoma: É a neoplasia pura germinativa mais rara no testículo, também sendo menos freqüente como componente de um tumor misto. Na sua apresentação inicial, é freqüente a metástase a distância, geralmente acometendo indivíduos entre a 2ª e 3ª décadas, sendo raro antes da puberdade.

O marcador mais importante deste tumor é o β HCG, aliado à morfologia, que deve apresentar células do citotrofoblasto, porém sendo mais expresso nas sinciciais. As CK 7,8,18 e 10 e o CEA são expressos nos 2 tipos celulares, e a PLAP em cerca de 50% dos coriocarcinomas.

Tumores do estroma e cordão sexual

Muito raros, os tumores das células de Sertoli, Leydig e granulosa, raramente apresentam dificuldade morfológica no diagnóstico diferencial dos tumores de células germinativas.

Os tumores de células de Leydig são positivos para os hormônios (e não os receptores) androgênicos e vimentina. Os de células de Sertoli exibem citoqueratinas e vimentina. Podem ser positivos também para enolase e EMA. O tumor de células da granulosa são positivos para vimentina, negativos para o EMA, sendo ocasional e expressão de CK8/18.

Tumores da região paratesticular

O tumor mais freqüente do epidídimo e cordão espermático, e o segundo da região paratesticular (sendo o primeiro o lipoma), é o tumor adenomatóide ou mesotelioma benigno não papilar. Proveniente da túnica albugínea ou vaginal, expressam CK, marcador mesotelial HBME 1 e EMA (em padrão luminal, focal), sendo negativas as pesquisas de CEA e de marcador epitelial Ber-EP4. O mesotelioma maligno dessa região apresenta perfil imuno-histoquímico idêntico ao da pleura e peritônio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Storkel S, van den Berg E. Morphological classification of renal cancer. *World J. Urol.* 1995; 13: 153-158.
2. Eble JN, Storkel S. Renal tumors and tumor-like conditions. Handout of United States and Canadian Academy of Pathology 1997.
3. Rumpelt HI, Storkel S, Moll R, Scharfe T, Thoenes W. Bellini duct carcinoma; further evidence for this rare variant of renal cell carcinoma. *Histopathology* 1991; 18: 115-122.
4. Pisciole F, Bondi A, Scappini P, Luciani L. "True" sarcomatoid carcinoma of the renal pelvis. *Eur. Urol.* 1984; 10: 350-355.
5. Kaiserling E, Krober S, Xiao JC, Shaumburg-Lever GS. Angiomyolipoma of the kidney. Immunoreactivity with HMB-45. Light and electron microscopic findings. *Histopathology* 1994; 25: 41-48.
6. Cintorino M, Vecchio MT, Bugnoli M, Petracca R, Leoncini P. Cytokeratin pattern in normal and pathological bladder urothelium: immunohistochemical investigation using monoclonal antibodies. *J. Urol.* 1988; 139: 428-432.
7. Weiss LM, Chang KL. Practical applications of immunohistochemistry. Handout, United States and Canadian Academy of Pathology 1999.
8. Hoshi S, Orikasa S, Numata I, Nose M. Expression of Leu-M1 antigens in carcinoma of the urinary bladder. *J. Urol.* 1986; 135: 1075-1077.
9. Shevchuck MM, Fenoglio CM, Richart RM. Carcinoembryonic antigen localization in benign and malignant transitional epithelium. *Cancer* 1981; 47: 899-905.
10. Tsujihashi H, Nakanishi A, Hisao M, Uejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BRDURD and Ki-67 immunostaining. *J. Urol.* 1991; 145: 846-849.
11. Okamura K, Miyake K, Koshikawa T, Asai J. Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Urol.* 1990; 144: 875-878.
12. Moriyama M, et al. Expression of C-ERB B-2 gene product in urinary bladder cancer. *J. Urol.* 1991; 145: 423-427.
13. Schapers RFM et al. Prognostic significance of type IV collagen and laminin immunoreactivity in urothelial carcinomas of the bladder. *Cancer* 1990; 66: 2583-2588.
14. Levin I et al. Expression of class I histocompatibility antigens in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to survival. *Cancer* 1991; 68: 2591-2593.
15. Coon JS, Weinstein RS. Blood group-related antigens as markers of malignant potential and heterogeneity in human carcinomas. *Hum. Pathol.* 1986; 17: 1089-1106.
16. Abenoza P, Manivel C, Frally E. Primary adenocarcinoma of urinary bladder. Clinicopathologic study of 16 cases. *Urol.* 1987; 29: 9-13.
17. Okada H et al. Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.* 1992; 421: 157-161.
18. Nagle R et al. Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Research* 1987; 47: 281-286.
19. Wojno KJ, Epstein JI. The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34βE12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995; 19: 251-260.
20. Bostwick DG. Prostate-specific antigen current role in diagnostic pathology of prostate cancer. *AJCP* 1994; suppl. 1: S31-S60.
21. Johan HJM, van Kieken. Prostate marker immunoreactivity in salivary gland neoplasms. A rare pitfall in immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993; 17: 410-414.
22. Kamoshida S, Tsutsumi Y. Extraprostatic localization of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen: distribution in cloacogenic glandular epithelium and sex-dependent expression in human anal gland. *Hum. Pathol.* 1990; 21: 1108-1111.

23. Sadi M, Walsh PC, Barrock ER. Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer: comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer* 1991; 67: 3057-3064.
24. Bonkhoff H, Remberg K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.* 1993; 422: 35-38.
25. Mottaz AE et al. Abnormal p53 expression is rare in clinically localized human prostate cancer: comparison between immunohistochemical and molecular detection of p53 mutations. *The prostate* 1997; 31: 209-215.
26. Nehans G et al. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer* 1988; 62: 1113-1123.
27. Barkova J et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int. J. Cancer* 1991; 49: 196-202.
28. Ware JL, Maygarden SJ, Koontz WW, Strom SC. Immunohistochemical detection of C-erb B-2 protein in human benign and neoplastic prostate. *Hum. Pathol.* 1991; 22: 254-258.
29. Mellon K et al. p53, C-erb B-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J. Urol.* 1992; 147: 496-499.
30. Sadasivan R et al. Overexpression of HER 21/new may be an indicator of poor prognosis in prostate cancer. *J. Urol.* 1993; 150: 126-131.
31. Renshaw AA, Corless CL. Papillary renal cell carcinoma - Histology and immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995; 19: 842-849.
32. Thoenes W, Störkel ST, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants - A report on 32 cases. *J. Pathol.* 1988; 155: 277-287.
33. Priollet BC et al. Renal chromophobe cell carcinoma and oncocytoma. A comparative morphologic, histochemical, and immunohistochemical study of 124 cases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1997; 121: 1081-1086.
34. Pea M, Bonetti F, Martignoni G, Henske EP, Manfrin E, Colato C, Bernstein J. Apparent renal cell carcinomas in tuberous sclerosis are heterogeneous: the identification of malignant epithelioid angiomyolipoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22: 180-187.

INTRODUÇÃO

A pele é originada da ectoderme em conjunto e sob a ação indutora do mesênquima primitivo. Esta colaboração, sobretudo em anexos epidérmicos, produz uma variedade de neoplasias de classificação complexa. A histogênese destas lesões depende do conhecimento morfológico, de técnicas histoquímicas, imuno-histoquímicas e de microscopia eletrônica.

Uma única camada de células constitui o revestimento do embrião, a ectoderme. Entre a sexta e oitava semana, é formada outra camada de células, a periderme. As células da basal dão, através de intensa atividade mitótica, origem ao epitélio germinativo, do qual derivarão os anexos epidérmicos.

A partir da 24ª semana de gestação, protuberâncias epidérmicas iniciam um crescimento em direção à derme, induzidas pelo mesênquima primitivo, o qual dará origem ao complexo folículo-sebáceo-apócrino. Assim, neoplasias originadas de glândulas apócrinas, podem acompanhar-se de componentes sebáceos ou, eventualmente, fazer parte de neoplasias do folículo piloso, o que dificulta a interpretação histogenética, sobretudo quando se estuda seu perfil imuno-histoquímico.

Um germe independente dá origem às glândulas sudoríparas écrinas, as quais conectam-se diretamente à epiderme. Embora provenientes de germes independentes, os ductos das glândulas écrinas e apócrinas têm estruturas histológicas, histoquímicas, e antigênicas semelhantes. O contrário ocorre em suas porções secretoras, diferentes bioquímica e antigenicamente, como veremos adiante.

Da crista neural, migram células primitivas que se distribuirão por todo o tegumento, constituindo o sistema melanocítico e concomitantemente o sistema neuro-endócrino do qual fazem parte as células de Merkel.

As células apresentadoras de antígenos, provenientes da medula óssea, distribuem-se na epiderme e derme. Estas têm prolongamentos dendríticos. As células de Langerhans foram as primeiras descritas, inicialmente por suas características morfológicas, como parte das células claras encontradas na epiderme. Posteriormente, foram demonstradas suas características antigênicas, expressando HLA-DR, CD1a, proteína S-100, dentre os principais marcadores. Mais recentemente, células com características dendríticas foram encontradas na derme, algumas com padrão antigênico semelhante às de Langerhans, outras denominadas de dendrócitos dérmicos, marcadas com o antígeno XIIIa da cascata da coagulação, além de expressarem CD45 e CD68. Assim, pode-se encontrar na derme, células dendríticas CD1a (+) / Fator XIIIa (-), CD1a (-) / Fator XIIIa (+) e CD1a (-) / Fator XIIIa (-), estas últimas expressando HLA-DR, atestando sua participação no sistema de células apresentadoras de antígenos.

O colágeno tipo I predomina na derme do embrião e do feto, sendo gradativamente substituído pelo de tipo III, quando na vida adulta, este predomina.

Estes são os conhecimentos básicos que vão nortear a nossa discussão sobre o estudo imuno-histoquímico da pele, que não pretende ser completo, mas sim mostrar as áreas de maior aplicabilidade na prática diária da patologia.

A IMUNO-HISTOQUÍMICA NA PELE

A imuno-histoquímica da pele vem se desenvolvendo vertiginosamente nos últimos anos, como nas demais áreas, sobretudo com a descoberta de sua aplicação na patologia cirúrgica, através de anticorpos contra antígenos em tecido incluído em parafina. Assim, a busca constante de marcadores específicos para diferenciar melanomas de lesões melanocíticas benignas, a tentativa de classificar tumores de anexos e a sempre difícil distinção entre hiperplasias linfóides benignas das malignas, tem tornado a tarefa da atualização, se não impossível, pelo menos muito árdua.

Para efeito didático, os marcadores imuno-histoquímicos utilizados na patologia cutânea serão divididos de acordo com as estruturas afetadas, ou seja, os tecidos de origem das alterações em questão, como segue:

1. NEOPLASIAS EPIDÉRMICAS

O diagnóstico imuno-histoquímico de neoplasias da epiderme deve ser reservado a raríssimos casos onde a morfologia convencional não permite melhor definição. Nestes casos, recomenda-se o uso de citoqueratinas de alto peso molecular como ferramenta diagnóstica auxiliar, quer usando-se o anticorpo genérico 34 β E12, contra CK 1, 5, 10, 11 e 14, quer através de anticorpos contra CKs individuais.

2. ALTERAÇÕES DERMO-EPIDÉRMICAS

Várias tentativas de estudar as modificações da junção dermo-epidérmica foram realizadas, sobretudo no estudo das doenças bolhosas e nas doenças por deposição de imunoglobulina. Apesar do desenvolvimento de anticorpos para material incluído em parafina, o estudo destas doenças, por imunoperoxidase não tomou grande impulso, provavelmente pela dificuldade técnica decorrente da deposição de fibrina e imunoglobulinas próprias do paciente, as quais induzem a adsorção dos anticorpos da cascata dos reagentes utilizados, gerando um fundo inespecífico ou mesmo falsa positividade da reação.

Feitas estas ressalvas, seguem-se algumas das aplicações da imuno-histoquímica nesta área da patologia dermatológica.

Epidermólise Bolhosa

O diagnóstico das epidermólises bolhosas foi, durante muito tempo, realizado apenas pela microscopia eletrônica. Buscava-se detectar o local da clivagem, a fim de identificar aqueles pacientes que iriam desenvolver doença mutilante, pois a clivagem se faria na derme, abaixo da membrana basal da epiderme, resultando na cicatrização das bolhas geradas por trauma nestas áreas fragilizadas, em escaras e úlceras deformantes, freqüentemente ocasionando sinéquias nos dedos, ou até mesmo a perda e reabsorção das extremidades.

Assim, na microscopia eletrônica, é possível detectar três tipos básicos de epidermólise bolhosa: **intra-epidérmica, juncional e dérmica**. A primeira, intra-epidérmica, mostra um plano de clivagem nas células basais da epiderme, no seu terço basal, um pouco acima no nível dos hemidesmossomos. Na segunda, juncional, a

clivagem dá-se ao nível da lâmina lúcida da membrana basal. Na terceira, dérmica, encontra-se a separação logo abaixo da lâmina densa.

Com base no conhecimento bioquímico da composição do complexo juncional dermo-epidérmico, anticorpos contra componentes desta estrutura permitiriam identificar os prováveis sítios de clivagem. Estudos com imunofluorescência utilizando anticorpos contra colágeno tipo IV (componente maior da lâmina densa da membrana basal), contra fibronectina e imunoglobulina obtida de pacientes com penfigóide bolhoso (BP) (com anticorpos contra os antígenos bp180 e bp230, encontrados no hemidesmossomo da célula basal da epiderme), puderam separar o plano de clivagem em:

- **epidérmico:** quando a positividade da fluorescência para colágeno IV e BP situa-se na base da bolha, isto é, rompeu-se a célula da basal e parte dela permaneceu na derme.
- **juncional:** quando a positividade da fluorescência para colágeno IV situa-se na base da bolha e o antígeno BP no teto da bolha. Portanto, plano de clivagem ao nível da lâmina lúcida, acima da densa (colágeno IV) e abaixo da célula basal da epiderme (BP no teto da bolha).
- **dérmico:** quando a positividade da fluorescência para colágeno IV e BP estão no teto da bolha. Portanto, o nível de clivagem situa-se abaixo da lâmina densa da membrana basal da epiderme.

Aplicando-se este conhecimento ao tecido fixado em formalina e embebido em parafina, a utilização de anticorpos contra colágeno IV permite que se identifique o tipo dérmico com segurança, e com alguma experiência, separar os tipos juncional e epidérmico com base na morfologia da célula basal do teto da bolha, se com a base fragmentada ou totalmente íntegra. Trabalho recente realizado pela equipe da Prof. Dra. Mirian N. Sotto, da Faculdade de Medicina da USP, comparando os resultados imunohistoquímicos (fluorescência e imunoperoxidase) com os de microscopia eletrônica, revelam grande correspondência entre as duas técnicas (comunicação oral). Desta forma, em se confirmando estes resultados, poder-se-á prescindir da microscopia eletrônica para estabelecer os grandes grupos da epidermólise bolhosa, em favor da técnica imunohistoquímica.

Penfigóide bolhoso, Dermatite Herpetiforme e Doença Bolhosa por IgA linear

A aplicação da imunoperoxidase nestas doenças tem sido escassa, sendo os resultados precários, sobretudo pela presença de coloração de fundo como anteriormente discutido. Neste particular, a imunofluorescência ainda é superior ao estudo de material fixado em formol e parafinado.

A base do estudo está no encontro de imunoglobulina G (contra os antígenos bp180 e bp230) na membrana basal da epiderme, nos caso de penfigóide bolhoso. Encontra-se deposição de IgA na membrana basal da epiderme, em padrão granular na dermatite herpetiforme e em padrão linear para doença bolhosa por IgA linear. O exame deve ser feito com cautela, pois na fibrina do conteúdo das bolhas, podem estar adsorvidas imunoglobulinas do próprio paciente, resultando em falsa positividade da reação ou intensa coloração inespecífica que mascara a verdadeira reação.

Embora doenças bolhosas intra-epidérmicas, o pênfigo vulgar (bolha acantolítica supra-basal) e o pênfigo foliáceo (bolha acantolítica sub-córnea), cabe ressaltar o

encontro de imunoglobulina entre os queratinocitos, conferindo um aspecto em tela de galinheiro. Novamente cabe a ressalva anterior, em favor do exame por imunofluorescência.

3. NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SUDORÍPARAS

As neoplasias de glândulas sudoríparas podem ser classificadas, do ponto de vista da imuno-histoquímica, em ductais e secretoras. Já mencionamos não haver diferenças entre ductos excretores de glândulas écrinas e apócrinas, ficando a diversidade na sua porção secretora. Para maior simplicidade, a tabela que se segue resume as principais diferenças e semelhanças entre ductos excretores e secretoras de glândulas écrinas e apócrinas, de acordo com a literatura:

Marcadores		Actina musc. liso	Ck8 (34BH11) CAM 5-2	CK10	CK14 LL002	CA 5.2	EMA	CE	Proteína S-100	Ferritina	Lisozi ma	Alfa-1-anti Q	HMFG-1 (BRST-2)
Ductos Excretores	Externa	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-
	Luz	-	-	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
Ductos Secret. Écrinos	Externa	+	-	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	Luz	-	+	?	?	+	+	+	+	-	-	-	-
Ductos Secret. Apócrin.	Externa	+	-	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Luz	-	+	?	-	+	+	-	-	-	+	+	+

Glossário: Actina musc. liso: actina- α de músculo liso; CK8: citoqueratina 8; CK10: citoqueratina 10; CK14: citoqueratina 14; CAM 5.2: Citoqueratina de baixo peso molecular; EMA: antígeno de membrana epitelial; CEA: Antígeno carcinoembrionário; Alfa 1 anti-QT: alfa 1 anti-quimiotripsina; HMFG-1: Fator da Globulina do Leite Humano (anticorpo BRST-2); ?: Desconhecido.

Assim, para diferenciar glândulas apócrinas e écrinas em sua porção secretora, é melhor utilizar os seguintes marcadores:

Antígeno	Ducto secretor apócrino	Ducto secretor écrino
CEA	-	+
S-100	-	+
Lisozima	+	-
α -1-Anti-quimotripsina	+	-
HMFG-1	+	-

A distinção entre neoplasias de ductos excretores e secretores pode ser obtida através do seguinte painel de anticorpos:

Antígenos	Ducto excretor	Ducto Secretor
Actina - α de músculo liso	-	+ (mio-epitélio)
CK8	-	+ (luminar)
CK14	-	+ (mio-epitélio)
EMA	+/-	+ (luz)
CEA	-	+ (luz écrina)
S-100	-	+ (luz écrina)
Ferritina	+ (camada externa)	-
Lisozima	-	+ (luz apócrina)
α -1-anti quimotripsina	-	+ (luz apócrina)
HMFG-1 (BRST-2)	-	+ (luz apócrina)

Outros estudos foram realizados em tumores de glândulas sudoríparas, com marcadores isolados como é o caso da actina α de músculo liso, de acordo com os tumores de origem écrina e apócrina, como segue:

Origem	Tipo	Actina α de músculo liso
Apócrinos	Cilindroma	+
	Hidrocistoma	+
	Adenoma Tubular	+
	Siringocistoadenoma papilífero	+
	Hidroadenoma papilífero	+
	Poroma	-
	Hidroadenoma de células claras	-
Écrinos	Espiroadenoma	+
	Siringoma condróide	+/-
	Siringoma	-
	Siringofibroadenoma	-
	Poroma	-
	Hidroacantoma simplex	-

Pela tabela acima, observa-se que há positividade para actina- α de músculo liso apenas nos tumores originados de ductos secretores, tanto apócrinos quanto écrinos, à exceção do siringocistoadenoma papilífero.

As citoqueratinas, exceto para CK8, CK10 e CK14 não são discriminantes para os vários tumores de glândulas sudoríparas como atestam numerosas pesquisas. É representativa a pesquisa de Wiley et al. ⁽¹⁾, cuja tabela de resultados utilizando anticorpos para diversos antígenos, demonstra o perfil predominantemente em quatro tipos de tumores de anexos:

	Espiroadenoma écrino	Cilindroma	Acrospiroma (hidroadenoma de células claras)	Siringoma condróide
AE1 (CK 10,14,15,16,19)	+ (7 d)	+ (8 sq; d)	+ (8 d; sq; cub)	+ (8 cub)
AE3 (CK 1-8)	+ (4 d)	+ (5 f)	+ (8 sq; d)	+ (6 d; sq)
CAM 5.2 (CK 8)	+ (4 d)	+ (3 sq)	+ (7 cub)	+ (4 d; sq)
34βE12 (CK 1,5,10,11,14)	+ (7 d)	+ (5 f)	+ (8 sq; d)	+ (4 d; sq)
EMA	+ (7 l)	+ (7 b; l)	+ (8 l)	+ (6 l)
S-100	+ (7 b)	+ (7 b; l)	+ (4 b)	+ (8 b)
Actina-α musc. Liso	+ (6 b; 8d)	+ (6 b)	+ (2b)	+ (1b)
Total de tumores	7	8	8	8

Glossário - d = célula ductal; l = célula luminal; b = célula basal; sq = célula escamosa; f = célula fusiforme; cub = célula cuboidal

Note-se que, nesta pesquisa, a proteína S-100 não discrimina tumores de células apócrinas e écrinas.

4. NEOPLASIAS DO FOLÍCULO PILOSO

A histologia dos folículos pilosos é bastante complexa, tanto pelas múltiplas diferenciações de suas células de revestimento, quanto pelas variações de tamanho (folículos pilosos terminais, intermediários ou velos, em ordem decrescente de comprimento e diâmetro), ou mesmo por seu ciclo de maturação individual ou coletivo.

O infundíbulo piloso, estrutura justa-epidérmica em forma de cone, de onde sai a haste pilosa já formada para o meio externo, tem estrutura histológica e imuno-histoquímica semelhante ao restante da epiderme, enquanto as estruturas situadas além da inserção dos ductos das glândulas sudoríparas (o istmo e o bulbo com sua haste) têm estruturas histológicas e imuno-histoquímicas diversas, conforme a área estudada. Além disto, há diferenças entre as estruturas embrionárias e as foliculares terminais do adulto.

As considerações acima justificam o estudo muito bem conduzido de Schirren et al⁽²⁾, verificando a distribuição, nos folículos pilosos do couro cabeludo, das citoqueratinas fetais, da involucrina, actina alfa de músculo liso e de CD34 (que identifica células hematopoiéticas primitivas, células dendríticas dérmicas e bainha fibrosa da raiz pilosa), em fetos/embriões e em adultos. Reproduzimos suas tabelas, as primeiras duas com avaliação de folículos pilosos fetais, enquanto as últimas duas, a folículos pilosos terminais anágenos de adultos.

Citoqueratinas de epitélios escamosos estratificados e involucrina								
Folículos pilosos fetais								
	CK1	CK4	CK5/6	CK10	CK13	CK14	CK17	Involucrina
EPIB	-	-	+++	-	-	+++	-	-
EPIS	+++	+++	-	+++	-	++	-	++
INB	-	-	+++	-	-	+++	++	-
INS	+++	+++	-	++	-	++	++	++
ISTH	-	-	++	-	-	+++	+++	+
ORS	-	-	+++	-	-	+++	++	+
BULGE	-	-	+++	-	-	+++	+++	-
IRS	-	+++	-	-	-	-	-	+
MC	-	-	-	-	-	-	-	-
SMC	-	-	-	-	-	-	-	++
FGC	-	-	+++	-	-	+++	+++	-
FRS	-	-	-	-	-	-	-	-
PI	-	-	-	-	-	-	-	-
PM	-	-	-	-	-	-	-	-

Glossário: EPIB: basal da epiderme, EPIS: supra-basal da epiderme, INB: basal do infundíbulo, INS: suprabasal do infundíbulo, ISTH: istmo, ORS: bainha externa do folículo piloso, BULGE: protuberância istmica, IRS: bainha interna do folículo piloso, MC: células matriciais, SMC: células supra-matriciais, FGC: células foliculares germinativas, FRS: bainha fibrosa da raiz folicular, PI: papilar folicular imatura, PM: papila folicular madura.

Citoqueratinas de epitélio colunar simples e outros antígenos								
Folículos pilosos fetais								
	CK7	CK8	CK18	CK19	CK20	αSMA	CD34	VIM
EPIB	-	-	-	+++	-	-	-	-
EPIS	-	-	-	++	-	-	-	-
INB	-	-	-	+++	-	-	-	-
INS	-	-	-	-	-	-	-	-
ISTH	-	-	-	+++	-	-	-	-
ORS	-	-	-	+++	-	-	-	-
BULGE	-	-	-	+++	-	-	-	-
IRS	-	-	+++	-	-	-	-	-
MC	-	-	-	+	-	-	-	-
SMC	-	-	-	-	-	-	-	-
FGC	-	-	-	+++	-	-	-	+
FRS	-	-	-	-	-	-	++	+++
PI	-	-	-	-	-	-	+++	+++
PM	-	-	-	-	-	-	-	++

O estudo desta tabela revela co-expressão nas células germinativas foliculares, de CK5/6, CK14, CK17 (queratinas de epitélio estratificado) e CK19 (queratina de epitélio colunar simples), com vimentina, refletindo seu caráter pluripotencial.

Citoqueratinas de epitélios escamosos estratificados e involucrina Folículos pilosos terminais em anágeno de adultos								
	CK1	CK4	CK5/6	CK10	CK13	CK14	CK17	Involucrina
EPIB	-	-	+++	-	-	+++	-	-
EPIS	+++	+++	-	+++	-	++	-	++
INB	-	-	+++	-	-	+++	-*	-
INS	+++	++	-	+++	-	++	-*	++
ISTH	-	-	+++	-	-	+++	+++	++
ORS	-	-	+++	-	-	+++	+++	++
IRS	-	+++	-	-	-	-	-	++
MC	-	-	-	-	-	-	-	-
SMC	-	-	-	-	-	-	-	++
FRS	-	-	-	-	-	-	-	-
PM	-	-	-	-	-	-	-	-

Glossário: EPIB: basal da epiderme, EPIS: supra-basal da epiderme, INB: basal do infundíbulo, INS: suprabasal do infundíbulo, ISTH: istmo, ORS: bainha externa do folículo piloso, IRS: bainha interna do folículo piloso, MC: células matriciais, SMC: células supra-matriciais, FRS: bainha fibrosa da raiz folicular, PM: papila folicular madura. (*): presente no feto, ausente no adulto

Citoqueratinas de epitélio colunar simples e outros antígenos Folículos pilosos terminais em anágeno de adultos								
	CK7	CK8	CK18	CK19	CK20	αSMA	CD34	VIM
EPIB	-	-	-	-*	-	-	-	-
EPIS	-	-	-	-*	-	-	-	-
INB	-	-	-	-*	-	-	-	-
INS	-	-	-	-	-	-	-	-
ISTH	-	-	-	-*	-	-	-	-
ORS	-	-	-	++	-	-	-	-
IRS	-	-	+++	-	-	-	-	-
MC	-	-	-	-*	-	-	-	-
SMC	-	-	-	-	-	-	-	-
FRS	-	-	-	-	-	-	+++	+++
PM	-	-	-	-	-	-	-	++

Deste estudo, aprende-se que:

1. As células basais da epiderme, infundíbulo piloso e células ístmicas são positivas para CK5/6.
2. As células supra-basais epidérmicas, infundibulares e da bainha interna do folículo piloso expressam CK4, o que não acontece com as demais estruturas.
3. Com exclusividade, CK19 identifica da bainha externa do folículo piloso.
4. As células supra-matriciais e a bainha interna expressam involucrina, indicando origem comum.
5. Células matriciais do bulbo piloso não expressam qualquer tipo de queratina, sugerindo tratar-se de células ainda não diferenciadas.
6. Células germinativas foliculares co-expressam vimentina e citoqueratina.
7. Entre outras estruturas, CD34 identifica a bainha fibrosa da raiz folicular.

Com base nestes dados, os mesmos autores estudaram carcinomas basocelulares e tricoblastomas, tidos com espectros de mesma origem, o primeiro maligno e o segundo benigno. Ambas as lesões tiveram em quase todos os casos estudados, células basalóides co-expressando CK5/6, CK14, CK17, CK19 com vimentina, observando-se no estroma, CD34 positivo, a exemplo da bainha fibrosa da raiz folicular. Conclui-se que o carcinoma basocelular e o tricoblastoma são neoplasias originadas em estruturas pilosas, e não da epiderme ⁽²⁾. Outros estudos comprovam os mesmos achados, acrescentando-se positividade para CK17, característica de células da bainha externa do pelo.

5. NEOPLASIAS MESENQUIMAIS

Neoplasias mesenquimais serão abordadas em outro capítulo deste livro. No entanto, gostaria de salientar dois tópicos interessantes, como segue:

Dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) e Dermatofibroma (DF)

Recente revisão dos aspectos encontrados nestas duas neoplasias dão conta de que a maioria dos DFSP expressam CD34, ocasionalmente contendo células fator XIIIa positivas, usualmente englobadas pela neoplasia, enquanto os DFs mostram-se fortemente positivos para este último antígeno, embora alguns casos possam conter células CD34 positivas, sempre em menor número. Desta forma, quando em casos duvidosos, recomenda-se a realização de estudo imuno-histoquímico com estes dois marcadores ⁽³⁾. Note-se que há uma corrente que pretende mudar o nome do dermatofibroma para "dendrocitoma" cutâneo.

Sarcoma de Kaposi

Um dos aspectos pouco comentados do sarcoma de Kaposi, além da possibilidade de conter células endoteliais positivas para fator VIII e para marcadores endoteliais, como CD34 ou CD31, é o fato, quase sempre esquecido, de que células endoteliais produzem membrana basal, cujo principal componente é o colágeno de tipo IV. Desta forma, o diagnóstico precoce do Sarcoma de Kaposi, nos casos suspeitos e de histologia duvidosa, podem ser esclarecidos através da imuno-histoquímica para este tipo de colágeno. Assim, ao examinar uma preparação de colágeno IV nestas lesões, pode-se observar uma fina trama formando uma rede, que corresponde à permeação por células endoteliais do sarcoma de Kaposi que, por vezes, são confundidas com fibroblastos. O colágeno tipo IV deveria ficar restrito às áreas de membrana basal, seja de vasos seja do epitélio, sem formar a rede acima mencionada. É claro que este tipo de argumentação cai por terra quando se estudam lesões pseudo-kaposiformes, em angiomas ou mesmo no caso de angiosarcomas.

6. DOENÇAS LINFO-PROLIFERATIVAS:

Este tópico é abordado em diversos outros capítulos deste Manual. Gostaria apenas de inserir um rápido comentário no que se refere às proliferações histiocíticas.

Recentemente, o grupo da Organização Mundial da Saúde denominado Histiocyte Society publicou um artigo de revisão da classificação das proliferações histiocitárias,

baseada nos novos conhecimentos a respeito dos histiócitos e células dendríticas. Desta forma, para sua classificação, é necessário, além de um estudo aprofundado de dados clínico-laboratoriais, definir qual o tipo de célula envolvido na doença em questão.

Reproduzo a tabela que orienta sua determinação, como segue:

Tipo de célula histiocítica	Antígenos positivos	Antígenos negativos
Macrófago	Lisozima, CD45, CD14 e CD68	Proteína S-100, CD1a, Fator XIIIa Ausência de grânulos de Birbeck (ME)
Indeterminada	CD45, Proteína S-100 e CD1a	Fator XIIIa. Ausência de grânulos de Birbeck (ME)
Langerhans	CD45, Proteína S-100 e CD1a. Presença de grânulos de Birbeck (ME)	CD14 e Fator XIIIa.
Dendrítica interdigitada	CD45 e Proteína S-100	CD14, CD1a, Fator XIIIa. Ausência de grânulos de Birbeck (ME)
Dendrocito dérmico	Fator XIIIa, CD45 e CD68	Proteína S-100, CD1a. Ausência de grânulos de Birbeck (ME)
Dendríticas foliculares	KiM4, CD21, CD35, Proteína S-100 (variável)	CD45 Ausência de grânulos de Birbeck (ME)

Assim determinada, a proliferação histiocítica poderá ser classificada de acordo com a evolução habitual nos tipos de comportamento biológico variado e nas de comportamento maligno. Na primeira, inclusas as proliferações de células dendríticas (de Langerhans, proliferações reativas, xantogranuloma juvenil, histiocitomas solitários), de macrófagos (hemofagocitoses primárias e secundárias), doença de Rosai-Dorfman e histiocitoma solitário de macrófagos. Nas de comportamento maligno, incluem-se as relacionadas com monócitos (leucemias monocíticas agudas, mielo-monocíticas agudas e crônicas, além dos sarcomas monocitários isolados), com células dendríticas (sarcoma localizado e disseminado, de acordo com o tipo de célula dendrítica), e relacionadas com células macrofágicas (sarcomas localizados ou disseminados). Desaparecem, portanto, os termos *linfoma histiocítico verdadeiro* e *histiocitoma maligno*, para dar lugar a sarcomas histiocitários, como acima mencionado.⁽⁴⁾

A menção desta classificação é importante para situar as proliferações histiocíticas no contexto da pele, contendo inovações, como o xantogranuloma juvenil ser uma proliferação dendrocítica, o histiocitoma poder ser classificado em dois grupos, um dendrocítico e outro macrofágico, e os sarcomas histiocíticos, nas suas diversas histogêneses.

7. Lesões Melanocíticas

O estudo imuno-histoquímico de lesões melanocíticas tem sido abordado de duas formas: diagnóstica e prognóstica.

Tentativas de obtenção de anticorpos monoclonais contra antígenos que distingam lesões benignas de malignas, portanto de valor diagnóstico resultaram em sua maioria infrutíferas, embora os anticorpos para HMB-45 e NKI-C3, ambos detectando antígenos semelhantes, porém com epítomos diferentes, tenham grande utilidade na identificação de metástases de melanoma em outros órgãos.

O anticorpo monoclonal HMB-45 (*Human Melanoma Black*), desenvolvido a partir de extratos de melanoma maligno metastático em linfonodo por Gown e colaboradores⁽⁵⁾, identifica pré-melanosomas, sendo altamente específico para células que os contenham. Desta forma, pode-se observar positividade em células de nevos melanocíticos, em seu componente juncional, raramente intra-dérmico, em nevos displásicos, nevos azuis e nevos de Spitz. Por outro lado, grande parte dos melanomas malignos, à exceção de melanomas fusocelulares e desmoplásicos, expressam positividade para este anticorpo. Em seu estudo de melanomas fusocelulares, Skelton e colaboradores⁽⁶⁾ encontraram 30 de 56 casos negativos para HMB-45. A positividade para HMB-45 neste tipo de melanoma parece ter pior prognóstico, quando comparado com os casos de negatividade.

De grande utilidade tem sido o uso deste anticorpo na identificação de lesões metastáticas nas quais a possibilidade de melanoma deve ser afastada. Quando positivo, usualmente, o diagnóstico de melanoma maligno se impõe. Embora, na maioria das vezes sua expressão seja diagnóstica para melanoma, é possível encontrar algumas neoplasias não melanocíticas HMB-45-positivas. É o caso dos angiomiolipomas, da linfangioleiomiomatose, do tumor de células claras do pulmão ("sugar tumor"), e em minha experiência, do leiomiosarcoma. Outros relatos de falsa positividade foram encontrados quando o anticorpo foi selecionado de fluido de ascite, os quais possivelmente estariam contaminados com outros anticorpos inespecíficos. Portanto, a positividade relatada em mama, glândulas sudoríparas, feocromocitomas, paragangliomas, plasmacitomas, carcinoma hepatocelular, cordoma, adenocarcinomas, linfomas, e sarcoma alveolar de partes moles, deve ser tomada analisada com cuidado⁽⁷⁾.

Alguns dermatopatologistas têm utilizado o HMB-45 para identificar a profundidade de infiltração, sobretudo naqueles casos onde há acentuada incontinência pigmentar, seja por ser a neoplasia muito pigmentada, seja por um processo de regressão, com destruição de parte da neoplasia, uma vez que melanófagos são negativos para este anticorpo.

Portanto, para concluir, o HMB-45 tem utilidade na afirmação diagnóstica do melanoma, porém não deve ser utilizado para a distinção entre lesões malignas e benignas.

A proteína S-100, inicialmente um antígeno suposto de grande utilidade na identificação de lesões melanocíticas, teve sua utilidade reduzida à identificação de lesões metastáticas. Nestas, a positividade para proteína S-100 associada à positividade para vimentina, em uma neoplasia com supostas características de melanoma maligno, favorecem este diagnóstico. Ressalve-se que várias outras neoplasias são S-100 e vimentina positivas, como o lipossarcoma, os condrossarcomas mesenquimais, os sarcomas de células claras, etc. A positividade é identificada tanto no citoplasma quanto no núcleo celular.

Em lesões melanocíticas cutâneas, a proteína S-100 é quase sempre positiva, tanto em lesões benignas, quanto malignas.

Recentemente, estudando a combinação da contagem de células em proliferação pelo Ki-67 (clone MIB-1) e oncogene bcl-2, observou-se que os nevos de Spitz, em sua maioria, apresentam baixa porcentagem de células MIB-1-reativas (0-2%). Isto,

combinado com sua negatividade para bcl-2 (70% dos casos), permite distingui-los dos melanomas. Em outras palavras, bcl-2 positivo e porcentagem de células MIB-1 reativas maior que 2% no componente dérmico permite até 96% de certeza para o diagnóstico de melanoma⁽⁸⁾.

Quanto ao prognóstico, estudos da proliferação celular, revelaram que, ao analisar melanomas com espessura maior do que 1,5 mm, há correlação com o potencial metastático quando a reatividade para MIB-1 foi alta (12,3% em média), quando comparada com os casos de baixa reatividade (0,7% em média)⁽⁹⁾. Não há correlação quando a espessura é menor que 0,76 mm.

Outro fator prognóstico parece ser a expressão, na lesão primária de beta 1 integrina, que, quando maior que 10% das células, relaciona-se positivamente com maior número de metástases ocultas em linfonodos sentinela (de drenagem da área afetada)⁽¹⁰⁾.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wiley EL, Milchgrub S, Freeman PG, Kim ES. Sweat gland adenomas. Immunohistochemical study with emphasis on myoepithelial differentiation. *J Cutan. Pathol.* 1993; 20:337-343.
2. Schirren CG, Burgdorf WHE, Sander CA, Plewig G. Fetal and adult hair follicle. An immunohistochemical study of anticytokeratin antibodies in formalin-fixed and paraffin embedded tissue. *Am. J. Dermatopathol.* 1997; 19(4):334-340.
3. Goldblum JR, Tuthill RJ. CD34 and Factor Xlla immunoreactivity in Dermatofibrosarcoma Protuberans and Dermatofibroma. *Am. J. Dermatopathol.* 1997; 19(2):147-153.
4. Favara BE, Feller AC, Jaffe ES et al. Contemporary classification of histiocytic disorders. The WHO comitee on histiocytic /reticulum cell proliferation. Reclassification working group of the Histiocyte Society. *Med. Pediatr. Oncol.* 1977; 29(3):157-166.
5. Gown AM, Vogel AM, Hookd, Gough F, McNutt MA. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am. J. Pathol.* 1986; 123:195-203.
6. Skelton HG, Maceira J, Smith KJ, Ccarthy WF, Lupton GP, GRAHAM JH. HMB-45 engative spindle cell malignant melanoma. *Am. J. Dermatopathol.* 1997; 19(6):580-584.
7. Bacchi CE, Bonetti F, Pea M, Martignoni G, Gown AM. HMB-45 A review. *Appl. Immunohistochemm.* 1996; 4(2):73-85.
8. Kauter-Lewensohn L, Hedblad MA, Wedje J, Larsson O. Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. *Mod. Pathol.* 1997; 10(9):917-920.
9. Boni R., Dognoglu A, Burg G, Muller B, Dummer R. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996; 35(3 Pt1):416-418.
10. Hieken TJ, Ronan SG, Parolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. Beta 1 integrin expression: a marker of lymphatic metastases in cutaneous malignant melanoma. *Anticancer Res.* 1996; 16(4B):2321-2324.

7. SISTEMA NEURO-ENDÓCRINO – CONCEITOS E MARCADORES GENÉRICOS

Vânia Nosé

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos para a purificação e caracterização bioquímica de vários hormônios, o desenvolvimento do radioimunoensaio e enzimaensaio, para a quantificação de hormônios e o desenvolvimento e refinamento de técnicas imuno-histoquímicas para a localização dos hormônios a nível celular, auxiliaram na identificação de diversos tipos celulares, sua importância funcional e sua interrelação com as outras células.

Os métodos imuno-histoquímicos além de caracterizar as células endócrinas nos diversos órgãos e sua distribuição, são de extrema importância no diagnóstico, classificação e prognóstico de neoplasias endócrinas.

Pela imuno-histoquímica, poderemos utilizar marcadores não hormonais de células endócrinas, ou os hormônios peptídeos, esteroides e seus receptores assim como aminas. Estes marcadores serão discutidos separadamente com os diversos tipos de neoplasias.

Os marcadores não hormonais de células endócrinas são de extrema importância em identificar células neuroendócrinas e seus tumores auxiliando no diagnóstico diferencial das neoplasias não endócrinas.

Os principais marcadores não hormonais são as cromograninas, enolase neuronio específica, sinaptofisinas, a proteína do produto genico 9.5, proteína S-100, antígenos linforeticulares e molécula de adesão de células neurais.

1. Cromograninas (Cg)

São proteínas secretórias, ácidas, solúveis, isoladas há 30 anos de granulos cromafínicos de adrenal bovina. As cromograninas são uma mistura complexa de proteínas, sendo os membros desta família melhor caracterizadas a Cromogranina A (CgA), a Cromogranina B (CgB) e a secretogranina II (SgII).

Estas três proteínas têm algumas propriedades bioquímicas comuns e têm ampla distribuição em granulos secretórios de células endócrinas e neuronais neurais. As funções destas proteínas são desconhecidas, porém há indícios de que têm papel fundamental no processamento e armazenamento de hormônios peptídeos, ou até possivelmente agir como hormônios.

Inúmeros anticorpos monoclonais para CgA (LK2H10), CgB e SgII assim como alguns anticorpos policlonais para as cromograninas podem ser utilizados em painéis de imuno-histoquímica.

A imunorreação para a CgA está presente em células da medula adrenal, em células endócrinas produtoras de hormônios como a hipófise anterior e células C da tireóide assim como em células principais da paratireoide e algumas células do sistema linfo-reticular.

Os padrões diferenciais de expressão de cromograninas será discutido nos capítulos correspondentes a diversos tumores.

2. Enolase neurônio específica (NSE)

As enolases são produtos de três locus gênicos independentes, designados alfa, beta e gama.

A enolase não neuronal (α α) está presente em tecidos fetais, células gliais e em muitos tecidos não endócrinos. A enolase β β é característica do músculo.

A enolase neurônio específica, γ γ , a princípio somente acreditada estar presente em neurônios é encontrada, com o uso de anticorpos policlonais, também em células neuroendócrinas e em músculo liso, mioepitélio, células tubulares renais, linfócitos, células brônquicas e pneumócitos tipo II.

Os anticorpos monoclonais contra a forma γ γ reagem predominantemente com fibras nervosas, e mais seletivamente com células neuronais, células da medula adrenal, e células de ilhotas pancreáticas. Entretanto, há grande variabilidade de imunocoloração nas neoplasias neuroendócrinas com o uso de anticorpos monoclonais, sendo estes mais específicos, porém a sensibilidade na detecção de tumores neuroendócrinos é menor do que com o uso de anticorpos policlonais.

3. Sinaptofisinas

Estas proteínas de membranas de vesículas sinápticas pequenas estão presentes no sistema nervoso central e periférico, assim como em células endócrinas secretoras de hormônios peptídeos.

Pela técnica imuno-histoquímica, observa-se padrão característico de imunocoloração, de forma pontilhada em regiões sinápticas assim como em células neuroendócrinas e suas neoplasias, como em feocromocitomas, paragangliomas, ganglioneuromas, ganglioneuroblastomas e neuroblastomas assim como em alguns tumores carcinóides, adenomas de hipófise, neoplasias de paratireóide, carcinomas neuroendócrinos do trato gastrointestinal, pele, árvore brônquica, e carcinoma cortical adrenal. Os melanomas e tumores mesenquimais são negativos

4. Proteína do produto gênico 9.5 (PGP 9.5)

Esta proteína solúvel, isolada de cérebro, é detectada através do uso de anticorpos policlonais ou monoclonais em fibras nervosas e neurônios do sistema nervoso, assim como em células neuroendócrinas, algumas células tubulares renais, corpo lúteo, células de Leydig e espermatogônia.

A PGP 9.5 não é detectada em células endócrinas normais do trato gastrointestinal, porém podem estar presente em tumores carcinóides.

O padrão difuso citoplasmático de imunocoloração é semelhante ao do NSE, assim como há correlação entre a positividade do NSE e do PGP 9.5 nos diversos tumores neuroendócrinos.

5. Proteína S-100 (S-100)

A proteína S-100 tem sido detectada por imuno-histoquímica em células reticulares dendríticas, células mioepiteliais, melanócitos, células de Schwann, epitélio biliar e acinares pancreáticas e em algumas células foliculares tireoideanas.

Nas neoplasias neuroendócrinas, a proteína S-100 está presente em células sustentaculares de feocromocitomas, tumores carcinóides e em células foliculoesteladas de adenomas hipofisários.

6. Antígenos linforeticulares

A glicoproteína dos linfócitos NK também pode ser detectada por imuno-histoquímica através de anticorpos monoclonais (Leu 7, CD57) no sistema nervoso central e periférico, células cromafínicas da medula adrenal, hipófise anterior, ilhotas pancreáticas e células neuroendócrinas do trato gastrointestinal.

Os tumores carcinóides, assim como tumores de ilhotas pancreáticas, feocromocitomas e carcinoma de pequenas células do pulmão podem expressar o CD57.

7. Molécula de adesão de células neurais (N-CAM)

A sialoglicoproteína de superfície celular que é mediadora de adesão celular, consiste de três peptídeos que também tem papel importante na proliferação e diferenciação celular.

Por imuno-histoquímica, a NCAM pode ser detectada em células do sistema nervoso e em células neuroendócrinas diversas. Algumas neoplasias neuroendócrinas podem expressar NCAM, como os feocromocitomas, tumores neuroendócrinos de pele, carcinoma medular de tireóide e raros carcinomas de pequenas células de pulmão.

SISTEMA NEUROENDÓCRINO DISPERSO DIFUSO

O Sistema Neuroendócrino Disperso Difuso consiste de uma variedade de células presente no Sistema Nervoso Central e periférico além de existirem em uma variedade de órgãos endócrinos clássicos. Como exemplos, as células da medula adrenal, hipófise, melanócitos, células de Merkel da pele, ilhotas pancreáticas, paragânglio, paratireóide, células C da tireóide, além de células do trato biliar e fígado, árvore broncopulmonar, trato gastrointestinal, células neuroendócrinas da mama, cérvix, rim, laringe, ovário, próstata, testículo entre outras localizações.

As células deste sistema também são conhecidas como paraneurônios, possuem a capacidade de produzir aminas, peptídeos e outras substâncias biologicamente ativas que podem agir como hormônios, neurotransmissores ou como reguladores paracrinis. Segundo Pearse e Takor-Takor, o sistema neuroendócrino disperso consiste de 40 tipos celulares individuais de origem embriológica diversa com características comuns. As células endócrinas que produzem esteróide, da córtex adrenal, ovário e testículo e as células foliculares tireoideanas não fazem parte deste sistema.

As células neuroendócrinas são distribuídas na maioria dos tecidos do corpo. Elas estão dispersas entre os outros tipos celulares como células isoladas ou em grupos de 3 a 4 células.

As células neuroendócrinas tem fenótipos que constituem a diversidade estrutural.

Os marcadores destas células são diversos e incluem os presentes em citosol, citoesqueleto, granulos secretórios, membranas de organelas secretórias e membranas celulares.

Alguns marcadores estão presentes em todas as células neuroendócrinas, outros são restritos à células específicas.

Como exemplos dos marcadores de células neuroendócrinas difusas:

Marcadores citoplasmáticos:

Enolase neurônio específica

Produto proteico do gene 9.5

Constituintes de granulo secretório:

Hormônios peptídicos

Amina

Cromograminas/secretograminas

Componentes de membrana de vesícula secretória:

Sinaptofisina

Sinaptobrevina

Cromomembrina B

Constituintes de membrana plasmática:

Receptores para peptídeos

Moléculas de adesão celular neural (NCAM)

Sintaxina

Outros marcadores:

Neurofilamentos

Citoqueratinas

Leu-7 (CD 57)

Proteína S-100

Neoplasias neuroendócrinas

Tumores neuroendócrinos podem ocorrer em qualquer órgão, incluindo aqueles que não contêm células neuroendócrinas normalmente.

As células neuroendócrinas (NE) e seus tumores, de acordo com De Lellis e Tischler, 1998 são:

Órgão	Célula	Neoplasia
Tireóide	Células C	Carcinoma medular
Pele	Células de Merckel	Carcinoma de Merkel
Hipófise	Células adeno-hipofisárias	Adenoma
Timo	Células NE	Carcinóide Carcinoma de células pequenas
Adrenal	Células da medula	Neuroblastoma Feocromocitoma
Pâncreas	Células NE	Neoplasia endócrina Carcinoma de células pequenas
Trato gastro-intestinal	Células NE	Carcinóide Carcinoma de pequenas células Carcinoma de grandes células
Trato respiratório	Células NE	Carcinóide Carcinóide atípico Carcinoma de pequenas células Carcinoma de grandes células
Diversis locais	Células NE	Carcinóide Carcinoma de pequenas células Carcinoma de grandes células Carcinomas de células endócrinas

De Lellis, RA; Tischler, AS. The dispersed neuroendocrine system. In: Functional Endocrine Pathology. Ed. K. Kovacs, S. Asa. Black well, 1998 – pag. 542

As neoplasias do Sistema Neuroendócrino Disperso são divididas em dois grupos principais:

- 1) Tipo neural: neuroblastomas, feocromocitomas e paragangliomas.
- 2) Tipo epitelial: carcinóides e neoplasias neuroendócrinas diversas.

Os marcadores imuno-histoquímicos das neoplasias do sistema neuroendócrino disperso são os marcadores gerais neuroendócrinos, como a enolase neurônio específica, cromograninas, sinaptofisinas, bombesinas, peptídeo liberador de gastrina, Leu-7 (HNC-1) e a molécula de adesão de célula neural (N-CAM).

Neoplasias neuroendócrinas específicas

1. Timo

Os carcinóides tímicos, fazem parte das neoplasias neuroendócrinas, são neoplasias pequenas ou grandes, encapsuladas ou invasivas, lobuladas, com necrose e hemorragia. Normalmente, estão associados com síndrome de Cushing. Por microscopia eletrônica, observa-se grânulos secretórios com características neuroendócrinas.

Por imuno-histoquímica, as células neoplásicas imunorreagem para cromograninas e NSE e a grande maioria apresenta imunopositividade para ACTH, sendo que algumas células ainda coram para somatostatina, calcitonina entre outros peptídeos.

2. Pele

As células Merkel da pele e os respectivos carcinomas neuroendócrinos têm características de diferenciação neuroendócrina, como a produção de inúmeros hormônios peptídeos e aminas, grânulos neurosecretórios e imunoreação de marcadores gerais de células neuroendócrinas.

Os tumores neuroendócrinos da pele ocorrem predominantemente na cabeça e pescoço ou extremidades em pacientes idosos e eram antigamente diagnosticados como linfomas ou carcinomas. Com o uso da imuno-histoquímica, a origem da neoplasia ficou definida, com imunoreação para cromograninas, NSE, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), calcitonina, polipeptídeo pancreático, somatostatina, ACTH, entre outros.

3. Mama

Os tumores carcinóides da mama, inicialmente descritos por Cubilla e Woodruff em 1987, permanecem um grupo de neoplasias controverso, pois uma grande proporção de carcinomas mamários imunoreagem para cromogranina A, além de apresentarem grânulos secretórios e argirofilia. Há também relatos de Síndrome de Cushing com produção de ACTH em carcinomas ductais da mama. Está sendo indicado na literatura de que as neoplasias carcinóides da mama podem representar diferenciação multidirecional de adenocarcinomas com características endócrinas.

4. Ovário

Os carcinóides de ovário originam-se de células neuroendócrinas presentes no ovário ou em teratomas ovarianos com grânulos secretórios característicos destas células.

Por imuno-histoquímica, há demonstração não só dos marcadores gerais de células neuroendócrinas (NSE, Cromograninas), como também de diversos hormônios como calcitonina, somatostatina, glucagon, serotonina, tireoglobulina, insulina, gastrina entre outros.

5. Testículo

Assim como os carcinóides de ovário, os carcinóides de testículo originam-se de células neuroendócrinas presentes no órgão ou em teratomas. Há imunoreação de cromograninas, NSE e inúmeros hormônios peptídeos ou aminas.

6. Próstata

As células neuroendócrinas e os diversos carcinomas neuroendócrinos prostáticos, entre eles adenocarcinomas com carcinoma neuroendócrino e carcinoma de células pequenas neuroendócrinas, imunoreagem os marcadores gerais destas células e uma grande variedade de hormônios, entre eles, ACTH, calcitonina, somatostatina, bombesina, gastrina, insulina e expressam o antígeno prostático específico.

7. Cérvix uterino

Os carcinomas neuroendócrinos do cérvix uterino são divididos histologicamente em bem diferenciados e pouco diferenciados com uma grande variedade de padrões histológicos.

Por imuno-histoquímica, podem ser identificados inúmeros hormônios (ACTH, serotonina, VIP, somatostatina, VIP, etc) além dos marcadores gerais das células endócrinas.

Há relato por Stoler et col, 1991 de associação do carcinoma neuroendócrino de células pequenas com o papiloma vírus tipo 18.

8. Pulmão

Para as neoplasias neuroendócrinas de pulmão, a classificação aceita é:

- a. Tumor neuroendócrino bem diferenciado (carcinóide típico)
- b. Carcinoma neuroendócrino bem diferenciado (carcinóide atípico)
- c. Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado tipo:
 1. de células grandes
 2. de células pequenas ou de células intermediárias.

Travis e cols, 1998, propuseram um sistema de classificação das neoplasias neuroendócrinas pulmonares, com nomenclatura tradicional:

- a. Carcinóide típico
- b. Carcinóide atípico
- c. Carcinoma neuroendócrino de células grandes
- d. Carinoma de células pequenas
- e. Carcinoma com características neuroendócrinas

9. Outros tumores neuroendócrinos

Em muitas outras localizações podem ocorrer estas neoplasias. Devemos mencionar a laringe, bexiga urinária, fígado, vesícula biliar, rim, seios paranasais, órbita, ouvido médio, mesentério, além do reto e colon.

Todas estas neoplasias imunoexpressam em número variável os marcadores gerais de células neuroendócrinas, além de alguns hormônios peptídeos ou aminas.

10. Tumores neuroendócrinos presentes na prática de patologia cirúrgica (Sumário)

- a. Tumor neuroendócrino da mama:
 - Carcinóide
 - Carcinoma com características neuroendócrinas
 - Carcinoma neuroendócrino

- b. Tumores neuroendócrinos ginecológicos:
 - Adenocarcinoma endometrial com natureza neuroendócrina
 - Carcinoma neuroendócrino de células pequenas do cervix uterino
 - Carcinóide do ovário
- c. Carcinoma neuroendócrino broncopulmonar:
 - Carcinóide
 - Carcinóide atípico
 - Carcinoma de pequenas células
 - Carcinoma de grandes células
- d. Adenocarcinoma gastrointestinal com características neuroendócrinas:
 - Adenocarcinoma com características NE
 - Carcinoma neuroendócrino
- e. Carcinoma de células de Merkel da pele
- f. Carcinóide e tumor glômico do ouvido médio
- g. Tumor neuroectodérmico primitivo
- h. Paraganglioma e paraganglioma gangliocítico extra-adrenal

11. Produção ectópica hormonal

A secreção hormonal inapropriada ou ectópica por tumores nos quais a célula normal não é produtora de hormônio, pode ser atribuída à células do sistema neuroendócrino disperso e difuso em parte, porém alguns tumores não neuroendócrinos são conhecidos como produtores de hormônios.

Alguns sarcomas, carcinomas hepatocelulares, timomas, carcinomas renais, e carcinomas espinocelulares do pulmão são conhecidos como produtores de hormônios.

Os carcinomas espinocelulares broncogênicos podem produzir ACTH, calcitonina, VIP, insulina, glucagon, MSH e β endorfina. Os hepatocarcinomas são conhecidos por produzir eritropoetina, PTH, hCG, HCS. Os carcinomas renais podem produzir PTH.

A presença de células endócrinas em tumores não endócrinos ocorre em vários órgãos, como mama (já descrito acima), endométrio, próstata, colon e reto, descrito por diversos autores, sendo o trabalho de De Lellis et cols, Tischler e Wolfe, 1984, amplo e elucidativo. Muitos tumores endócrinos também podem produzir outras substâncias como mucina, no carcinóide de células em sinete do apêndice; calcitonina e tireoglobulina, nos tumores mistos medulares e foliculares da tireóide.

LEITURAS PARA CONSULTA

1. Aunis D. Chromogranine A: Fonction pro-hormonale et régulation de la synthèse dans les cellules neuroendocrines. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 1991; 52:348-354.
2. Capella C et al. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Virchows Archiv.* 1995; 425:547-560.
3. Cubilla AL, Woodruff JM. Primary Carcinoid Tumors of the breast. A report of eight patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 1987; 11:248-292.
4. De Lellis RA. Endocrine Tumors in: *Diagnostic Immunopathology Second Edition*, edited by R.B. Colvin, A.K. Bhan, and R.T. McCluskey. Raven Press, Ltd., New York, 1995; p 551-577.
5. De Lellis RA, Dayal Y. Neuroendocrine system. In: *Histology for Pathologists. 2nd Ed.* Edited by SS Sternberg Lippincott-Raven. Philadelphia: 1997; p 1133-1152.
6. De Lellis RA, Tischler AS. The dispersed neuroendocrine cell system. In: *Functional Endocrine Pathology. 2nd Ed.* Edited by K. Kovacs and SL Asa. Blackwell Sci., Malden, MA, 1998; p 529-549.
7. De Lellis RA, Sternberger LA, Mann RB, Banks PM, Nakane PK. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. *American Journal of Clinical Pathology* 1979; 71:483-388.
8. De Lellis RA, Tischler AS, Wolfe HJ. Multidirectional differentiation in neuroendocrine neoplasms. *J. Histochem. Cytochem* 1984; 32:899-904.
9. De Lellis RA. Does the Evaluation of Proliferative Activity Predict Malignancy or Prognosis in Endocrine Tumors? *Human Pathology*, 1995; 26(2):131-134.
10. Gilks CB et al.: Large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: A clinicopathologic study of 12 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 21(8):905-914.
11. Graf AH et al.: Primary neuroendocrine differentiated mucinous adenocarcinoma of the vulva: case report and review of the literature. *Anticancer Res.* 1998; 18:2041-2045.
12. Heenan PJ et al. Primary cutaneous neuroendocrine carcinoma (Merkel cell tumor). An adnexal epithelial neoplasm. *Am. J. Dermatopathol.* 1990; 12:7-16.
13. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29:577-580.
14. Jahn R, De Camilli P. Membrane proteins of synaptic vesicles: markers for neurons and endocrine cells. In: *Markers for Neural and Endocrine cells. Molecular and Cell Biology. Diagnostic applications*, ed by M. Gratzl and K Langey. VCH Weinheim: 1991; 25-91.
15. Jin L et al. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in normal and neoplastic human neuroendocrine tissue. *Am. J. Pathol.* 1991; 138:961-969.
16. Khurana KK et al.: Ovarian neuroendocrine carcinoma associated with a mucinous neoplasm. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1994; 118:1032-1034.
17. Kiriakogiani-Psaropoulou P et al. The value of neuroendocrine markers in non-small cell lung cancer: a comparative immunohistopathologic study. *Lung Cancer* 1994; 11:353-364.
18. Kloppel G et al. Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World of Surg.* 1996; 20:132-141.
19. Langley K. The neuroendocrine concept today. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 733:1-17.
20. Lantuejoul S et al.: Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22(10):1267-1276.
21. Larsson L, Alumets J, Eriksson B, Hakanson R, Lundquist G, Oberg K, Sundler F. Antiserum Directed Against Chromogranin A and B is a Useful Marker for Peptide Hormone – Producing Endocrine cells and Tumors. *Endocr. Pathol.* 1992; 3:14-22.
22. Lloyd RV. Use of molecular probes in the study of endocrine disease. *Hum. Pathol.* 1987; 18: 1199-

23. Lloyd RV. Introduction to molecular endocrine pathology. *Endocrine Pathol.* 1993; 4:64-72.
24. Lloyd R.V. The neuroendocrine and Paracrine Systems in: *Diagnostic Surgical Pathology*. Second Edition. ed: Stephen S. Sternberg. Raven Press, Ltd, New York, 1994; p 561-570.
25. Lloyd RV, Wilson BS: Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science* 1983; 222:628-630.
26. Miettinen M. Immunohistochemical markers for gastrointestinal, urothelial and Merkel cell carcinomas. *Mod Pathol* 1995; 8:384-388.
27. Moll R, Franke WW. Cytoskeletal differences between human neuroendocrine tumors: A cytoskeletal protein of molecular weight 46,000 distinguishes cutaneous from pulmonary neuroendocrine tumors. *Differentiation* 1985; 30:165-175.
28. Mukai M, Torikata C, Iri H et al. Expression of neurofilament triplet proteins in human tumors. An immunohistochemical study of paraganglioma, ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* 1986; 122:28-35.
29. Pagani A, Forni M, Tonini GP, Papotti M, Bussolati G. Expression of members of the chromogranin family in primary neuroblastomas. *Diagn. Mol. Pathol.* 1992; 1:16-24.
30. Pearse AGE. The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept: Related endocrine peptides in brain, intestine, pituitary cutaneous glands. *Med. Biol.* 1977; 55: 115.
31. Pearse AGE, Takor-Takor T. Embryology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. *Fed. Proc.* 1979; 38:2288-2294.
32. Robberecht P, Lingier P, Woussen-Colle MC. Current status on chromogranin A and pancreastatin. *Acta Gastro-Enterologica Belgica* 1993; 56:261-263.
33. Rosa P, Gerdes HH. The granin protein family: Markers for neuroendocrine cells and tools for diagnosis of neuroendocrine tumors. *J. Endocrinol. Invest.* 1994; 17:207-225.
34. Schmechel D et al. Neuron specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 1978; 276:834-836.
35. Soga J. Carcinoids of the colon and ileocecal region; a statistical evaluation of 363 cases collected from the literature. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1998; 17:139-148.
36. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorse radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 1970; 18:315-333.
37. Stoler MH, Mills SE, Gersell DJ, Walker AN. Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix. A human papillomavirus type 18 – associated cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991; 15:28-32.
38. Thomas RM et al. Gastric carcinoids; an immunohistochemical and clinicopathologic study of 104 patients. *Cancer* 1994; 73:2053-2058.
39. Travis WD et al. Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. *Hum Pathol* 1998; 29:272-279.
40. Travis WD et al. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with classification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 23:935-944.
41. Travis WD et al. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large cell neuroendocrine carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991; 15:529-553.
42. Tsang WYW, Chan JKC. Endocrine ductal carcinoma in situ (E-DCIS) of the breast. A form of low-grade DCIS with distinctive clinicopathologic and biologic characteristics. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20:921-943.
43. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; 49(3):497-528.

8. HIPÓFISE

Vânia Nosé

Os métodos imuno-histoquímicos têm contribuído no diagnóstico e classificação de diversas neoplasias produtoras de hormônios, e têm auxiliado na correlação clínico-patológica de tumores, além de primariamente identificar células produtoras de um ou mais hormônios (células pluri-hormonais) por imunomarcagem dupla.

Para melhor interpretação dos achados imuno-histoquímicos, deve-se levar em consideração de que a técnica não é quantitativa e não permite avaliar a taxa de síntese ou de liberação hormonal.

As células hipofisárias têm sido classificadas a longo tempo de acordo com as características tintoriais em acidofílicas, basofílicas e cromóforas. Com introdução da imuno-histoquímica, da microscopia eletrônica e da imunomicroscopia eletrônica, esta classificação deixou de ser usada, e as células são classificadas atualmente de acordo com a produção hormonal de cada uma.

As células adeno-hipofisárias, na ultra-estrutura, mostram características de células epiteliais, e contêm organelas completas requeridas para produção proteica e eliminação do material. Os grânulos secretórios variam em número, tamanho, eletrodensidade e forma. Essas características, entretanto, são insuficientes para identificação precisa de células hipofisárias.

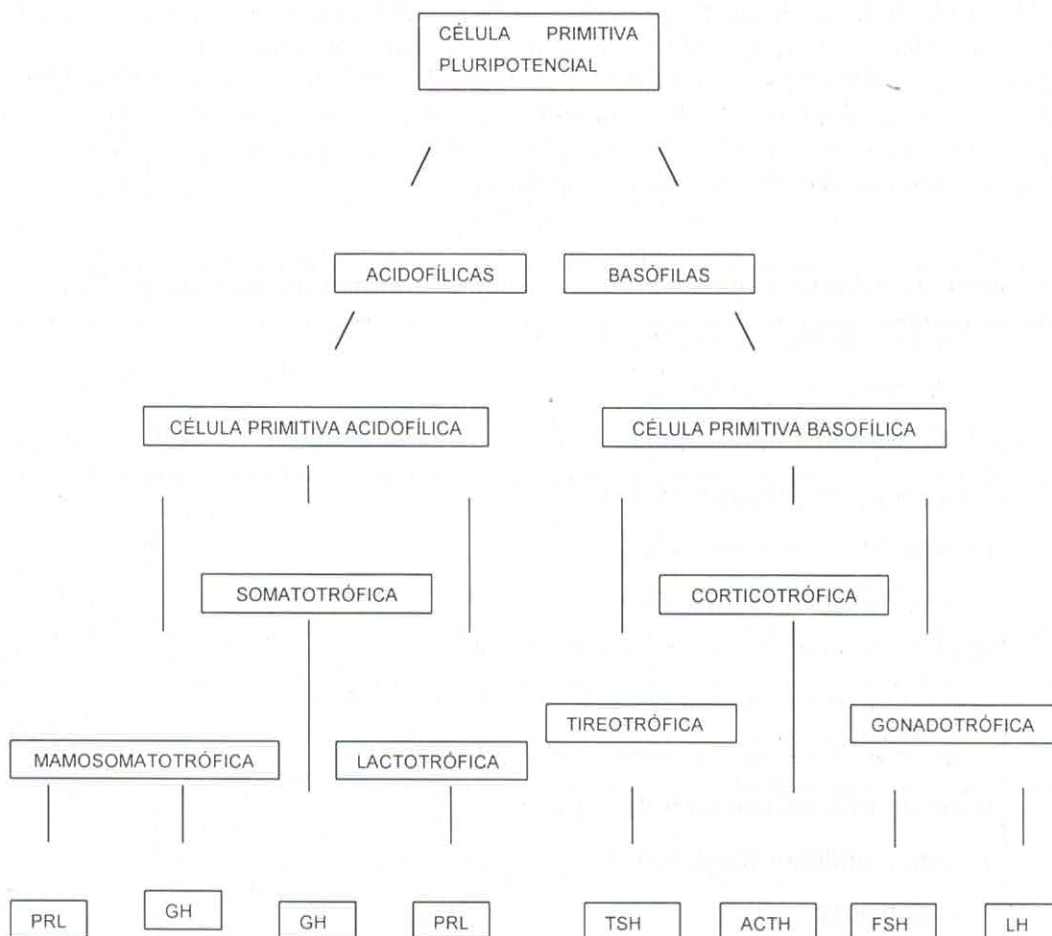
Atualmente, as células adeno-hipofisárias são classificadas em 5 tipos, (Tabela 1 e Figura 1) ⁽¹⁾.

Célula	Produto	% de Células	Localização	Imunocoloração
Somatotrófica	GH	50%	Asas laterais	GH
Lactotrófica	PRL	10-30%	Asas postero-laterais	PRL
Corticotrófica	ACTH	10-20%	Porção central, borda mucóide	ACTH, Beta-lipotrofina, alfa-endorfina
Gonadotrófica	LH/FSH	10%	Difusa na pars distalis	FSH e LH
Tireotrófica	TSH	5%	Borda mucóide anterior	TSH

As células somatotróficas coram-se fortemente para o hormônio de crescimento (GH), as células lactotróficas ou mamotróficas coram-se para a prolactina normalmente de forma globular, perinuclear, correspondendo ao complexo de Golgi. As células corticotróficas coram-se com forte intensidade para o hormônio adrenocorticotrófico, β -lipotrofina e alfa-endorfina. As células gonadotróficas coram-se para os hormônios foliculo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) ou para ambos, e as células tireotróficas coram-se difusamente, finamente granular para o hormônio tireotrófico (TSH). As células somatotróficas correspondem aproximadamente a 50% das células e estão localizadas principalmente nas asas laterais. As células lactotróficas correspondem 10 a 30% de todas as células adeno-hipofisárias, e estão localizadas principalmente na região pósterolateral e difusamente na adenohipófise. As células corticotróficas também correspondem aproximadamente 10 a 20% das células estão localizadas principalmente na asa mucóide

central e pars intermedia. Coram-se também para o PAS. As células gonadotróficas correspondendo ao redor de 10% das células adenohipofisárias, estão uniformemente distribuídas na adenohipófise e são positivas para o PAS. As células tireotróficas, também PAS positivas, correspondendo apenas 5% das células adenohipofisária estão localizadas principalmente na borda mucóide anterior ⁽¹⁾.

Figura 1 – Diferenciação das células adeno-hipofisárias



Os marcadores não hormonais das células adeno-hipofisárias são as cromograninas, enolase neurônio específica, neurofisinas, sinaptofisinas, proteína S-100, citoqueratinas e neurofisinas.

Cromograninas - As células adenohipofisárias coram-se com anticorpos anti-cromograninas, porém a cromogranina A está presente nas células TSH, FSH, LH e as que contêm sub-unidade alfa. As células de prolactina são negativas para cromogranina A.

Enolase neurônio específica - Todas as células da adeno-hipófise imunoexpressam NSE.

Neurofisinas - Somente as células ACTH imunocoram para esta proteína.

Sinaptofisinas - Foram demonstradas nas células GH, PRL, TSH, FSH e LH.

Proteína S-100 - Identificada nas células foliculoesteladas da adeno-hipófise.

Citoqueratinas - Somente as citoqueratinas de baixo peso molecular estão presentes, principalmente nas células ACTH. Estas células têm um marcador pan-epitelial, o anticorpo monoclonal mABlue-5, imunocorando também os corpúsculos hialinos de Crooke das células corticotróficas. As células GH e PRL também imunocoram para estes filamentos intermediários. As células FSH, LH e TSH não imunocoram.

A classificação utilizada atualmente ⁽¹⁾, é baseada nos estudos completos de 1200 adenomas retirados cirurgicamente de materiais não selecionados. Baseia-se na separação dos adenomas hipofisários em grupos distintos com correlação de características morfológicas e ultraestruturais, atividade endócrina e comportamento biológico, conforme demonstrado na Tabela 2. A classificação proposta ⁽²⁾ assim como a incidência dos adenomas encontra-se na Tabela 3.

1.	Adenoma de células somatotróficas	(10)
	• Densamente granulado	(05)
	• Esparsamente granulado	(05)
2.	Adenomas de células lactotróficas	(29)
	• Densamente granulado	(01)
	• Esparsamente granulado	(28)
3.	Adenoma misto de células somatotróficas	(05)
4.	Adenoma de células primitivas acidofílicas	(03)
5.	Adenoma de células mamossomatotróficas	(01)
6.	Adenoma de células corticotróficas	(14)
	• Ativo endocrinologicamente	(11)
	• Silencioso	(03)
7.	Adenomas de células gonadotróficas	(07)
8.	Adenoma de células tireotróficas	(01)
9.	Adenoma de células "null"	(19)
	• Não oncocítica	(13)
	• Oncocítica	(06)
10.	Adenoma plurihormonal	(10)
11.	Adenoma não classificável	(01)

⁽²⁾

A classificação proposta à Organização Mundial de Saúde ⁽³⁾ é baseada na correlação clínica e patológica de mais de 8.000 tumores hipofisários estudados.

A proposta é baseada em 5 itens principais: atividade endócrina, imagens radiológicas, achados cirúrgicos, aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais. A classificação histológica dos tumores adeno-hipofisários sugerida pelo grupo é:

1. Adenoma

- a) Típico

De acordo com o padrão de crescimento:

- a) Expansivo
- b) Invasivo histologicamente

2. Carcinoma

3. Não adenoma

De acordo com a classificação imuno-histológica, a proposta de classificação seria de acordo com a imunorreatividade principal:

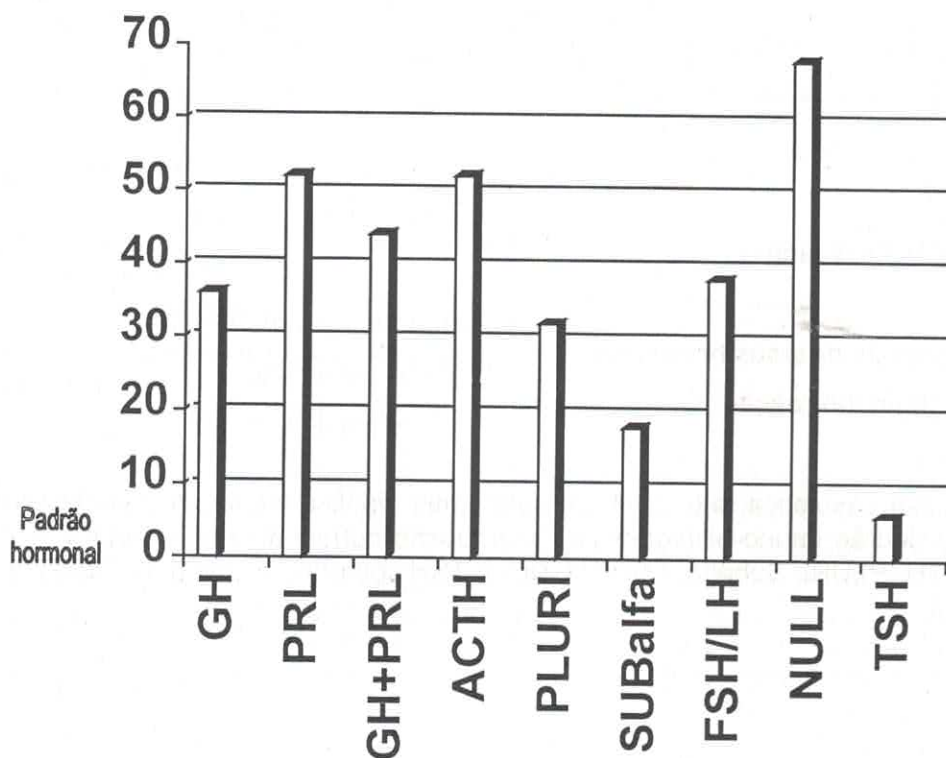
- a) GH
- b) PRL
- c) GH e PRL
- d) ACTH
- e) FSH / LH / sub-unidade α
- f) TSH
- g) Combinações de diversos hormônios
- h) Ausência de imunorreação

Em nossa casuística, até 1994, os adenomas hipofisários foram classificados de acordo com o padrão imuno-histoquímico de produção hormonal, em tumores GH, PRL, GH+PRL, ACTH, PLURI, Subalfa, FSH/LH, Null e TSH conforme exposto na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos 344 adenomas hipofisários segundo o sexo e o subtipo hormonal imuno-histológico

SUBTIPO HORMONAL	MASCULINO		FEMININO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
GH	22 (14,0)	61,1	14 (7,5)	38,9	36 (10,5)	100,0
PRL	28 (17,8)	53,8	24 (12,8)	46,2	52 (15,1)	100,0
GH + PRL	15 (9,6)	34,1	29 (1,5)	65,9	44 (12,8)	100,0
ACTH	6 (3,8)	11,	46 (24,6)	88,5	52 (15,1)	100,0
FSH/LH	21 (13,4)	55,3	17 (9,1)	44,7	38 (11,0)	100,0
SUBalfa	12 (7,6)	70,6	5 (2,7)	29,4	17 (4,9)	100,0
TSH	1 (0,7)	20,0	4 (2,1)	80,0	5 (1,5)	100,00
PLURI	14 (8,9)	45,2	17 (9,1)	54,8	31 (9,0)	100,0
NULL	38 (24,2)	55,1	31 (16,6)	44,9	69 (20,1)	100,0
TOTAL %	157 (100,0)	47,6	187 (100,0)	52,4	344 (100,0)	100,0

Figura 2 – Distribuição dos 344 adenomas hipofisários conforme o subtipo hormonal imuno-histológico.



Realizamos também a correlação dos dados histológicos de coloração histoquímica com o subtipo hormonal imuno-histoquímico, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos adenomas hipofisários de acordo com a coloração histoquímica e com o subtipo hormonal imuno-histológico

	ACIDÓFILO		BASÓFILO		CROMÓFOBO		TOTAL
	N	%	N	%	N	%	
GH	27	20,8	0	0	9	4,8	36
PRL	42	32,3	0	0	10	5,4	52
GH+PRL	40	30,8	0	0	4	2,1	44
ACTH	1	0,8	24	85,7	27	14,5	52
PLURI	12	9,2	2	7,1	17	9,1	31
SUBalfa	1	0,8	0	0	16	8,6	17
FSH/LH	2	1,5	0	0	36	19,3	38
NULL	5	3,8	2	7,1	62	33,3	69
TSH	0	0	0	0	5	2,7	5
TOTAL	130	37,8	28	8,1	186	54,1	344

ADENOMA DE CÉLULAS SOMATOTRÓFICAS

Os adenomas de células somatotróficas secretam o hormônio de crescimento em excesso, e estão associados clinicamente com a acromegalia e gigantismo. Podem se mostrar como microadenomas intracaseosos ou como macroadenomas, comprimindo ou infiltrando os seios esfenóides ou caseosos, bem como o nervo óptico. Os sintomas locais podem predominar, como alterações visuais e dores de cabeça.

O adenoma é mais comumente localizado em uma das asas laterais, que é local principal das células produtoras de hormônio de crescimento na hipófise normal. Em raros casos o adenoma é ectópico e pode ser detectado em seios esfenóides ou região parafaríngea.

Raramente hiperplasia de células somatotróficas são relatadas. Etiologia extra-hipofisária do hipersomatotropismo compreende não só os adenomas ectópicos, como vários tumores produtores de hormônios de crescimento assim como o excesso de secreção do fator liberador de GH (GHRH).

Estudos imuno-histoquímicos demonstram uma positividade variável em adenomas esparsamente granulados, sendo que a reação é mais fortemente demonstrado na região de Golgi, enquanto que os tumores densamente granulados são fortemente reativos.

Os tumores mistos produtores de hormônios de crescimento e de prolactina são bimorfos, constituídos por 2 tipos de células separadas. Os tumores de células acidofílicas primitivas são tumores monomórficos mostrando um crescimento rápido. São compostos por células originados de células positivas acidofílicas secretantes de GH e de PRL. Os adenomas de células mamossomatotróficas são raros, de crescimento lento, monomórficos, associados com aumento de níveis séricos de hormônio de crescimento e em alguns casos, de hiperprolactinemia. Os dois hormônios podem ser localizados no citoplasma da mesma célula.

Os carcinomas produtores de hormônios de crescimento são raros, crescem rapidamente e dão metástases à distância.

ADENOMAS DE CÉLULAS MAMOTRÓFICAS

Os adenomas secretores de prolactina resultam em vários graus de hiperprolactinemia, com manifestações clínicas distintas como a síndrome de galactorrêia-amenorréia em mulheres e diminuição do libido e impotência em homens. Infertilidade pode ocorrer em ambos os sexos. Em mulheres na pós-menopausa e em alguns homens, os adenomas de células produtoras de prolactina podem apresentar-se clinicamente como tumores não funcionantes.

A técnica imuno-histoquímica detecta presença de prolactina em neoplasias hipofisárias com grande sensibilidade. Em materiais histológicos, 2 padrões de imunocoloração podem ser encontrados. Tumores constituídos por células densamente granuladas mostram uma positividade granular forte sobre toda a área citoplasmática. Em tumores esparsamente granulados, nos quais há uma pequena quantidade de grânulos neurosecretórios, a positividade da imunorreação é restrita ao complexo de Golgi, enquanto a imunomicroscopia eletrônica demonstra imunoprecipitado específico somente nos grânulos neuro-secretórios.

ADENOMA DE CÉLULAS PRIMITIVAS ACIDOFÍLICAS

Os adenomas de células primitivas acidofílicas são imaturos, geralmente agressivos, de crescimento rápido, com produção bi-hormonal associado primariamente com hiperprolactinemia. Os níveis séricos de prolactina são consideravelmente menores do que esperado naqueles casos de adenoma de células produtoras de prolactina de tamanhos comparáveis. Os níveis séricos de hormônio de crescimento não estão muito aumentados, mas alguns sinais físicos de acromegalia podem se desenvolver. O quadro histológico mostra um padrão difuso de proliferação de células adeno-hipofisárias que são, na sua grande maioria, cromóforas ou fracamente acidofílicas. A imuno-histoquímica destes tumores mostra maior positividade para prolactina do que para o hormônio de crescimento.

ADENOMAS MAMO-SOMATOTRÓFICO

Estes adenomas raros são de crescimento lento, bem diferenciado, e causam acromegalia ou gigantismo, com níveis ligeiramente elevados de prolactina. Histologicamente, são francamente acidofílicos, e têm um padrão difuso ou trabecular. A imuno-histoquímica demonstra um padrão bi-hormonal que, nestes casos, também pode ser difícil de separar daqueles adenomas mistos. A microscopia eletrônica demonstra adenoma altamente diferenciado, semelhante ao adenoma de células produtoras de hormônio de crescimento densamente granulado.

ADENOMAS DE CÉLULAS CORTICOTRÓFICAS

1. Funcionantes

Originam-se habitualmente na borda mucóide da hipófise e são tumores pequenos, considerados microadenomas. Geralmente não medem mais que 1.5mm em

diâmetro. O quadro clínico relacionado com a hiperfunção predomina sobre os sintomas secundários ao seu tamanho e invasividade.

Os adenomas produtores de ACTH são habitualmente basofílicos e positivos para a coloração do P.A.S, com padrão sinusoidal predominante. Tumores cromófbos são raros, sendo estes com padrão difuso e com pouca ou nenhuma positividade para o P.A.S.

Estudo imuno-histológico mostra intensa positividade das células para o hormônio adrenocorticotrófico, assim como para a β -lipotrofina e para a alfa-endorfina. Anticorpos contra a porção C-terminal da molécula de ACTH também mostram intensa positividade. Os tumores cromófbos apresentam pouca ou nenhuma imunorreatividade para o ACTH.

2. Silenciosos

Os adenomas corticotróficos silenciosos são neoplasias hipofisárias raras mostrando imunorreatividade para anticorpos contra ACTH, porém sem associação clínica com hipercortisolismo, com aparência clínica de adenomas não funcionantes. A sintomatologia mais freqüente é o déficit visual. Estes tumores formam um grupo heterogêneo de adenomas representados por 3 entidades morfológicas distintas, com patogênese desconhecida, separadas por dados ultra-estruturais, sendo que a imuno-histoquímica demonstra que os subtipos I e II dos adenomas corticotróficos silenciosos exibem um grau variado de positividade para o ACTH e somente uma pequena minoria dos adenomas do tipo III reagem com este anticorpo utilizado, podendo imunorreativar com anticorpos contra as endorfinas.

ADENOMAS DE CÉLULAS GONADOTRÓFICAS

Os tumores produtores de gonadotrofina são raros e compreendem aproximadamente 7% de todos os adenomas hipofisários. São cromófbos, apresentam padrão sinusoidal, bem vascularizados, com formação de pseudo-rosetas. Alguns tumores são de difícil imunocoloração para FSH, LH ou ambos, talvez pela quantidade pequena de grânulos secretórios, pequena quantidade de secreção ou produção de hormônios.

A técnica de avidina-biotina-peroxidase ajuda muito na coloração das sub-unidades alfa e beta de FSH e LH. Por causa destas dificuldades de imunocoloração normalmente estes tumores necessitam de microscopia eletrônica para um diagnóstico mais preciso. A microscopia mostra características únicas, ligadas ao sexo. Tumores em homens são similares aos adenomas de células não-null ou são mais diferenciados tendo um núcleo uniforme de células poliédricas com processos citoplasmáticos bem desenvolvidos. Os adenomas em mulheres consistem de células altamente diferenciadas, alongadas, com processos finos, apresentando núcleo excêntrico, esférico, contendo o aparelho de Golgi grande, composto de estruturas vesiculares com material eletrolucente (Golgi em favo de mel). Esta última característica é um marcador de tumores gonadotróficos em mulheres.

ADENOMAS DE CÉLULAS TIREOTRÓFICAS

Os adenomas produtores de TSH são raros, correspondendo a aproximadamente 1% de todos os adenomas hipofisários. O quadro clínico pode corresponder ao

hipertireoidismo com altos níveis de TSH ou ocorrem em pacientes com hipotireoidismo de longa duração. A imunocoloração para hormônio tireotrófico demonstra intensa imunorreatividade no citoplasma da célula tumoral. Há casos em que há dificuldade na imunodemonstração deste hormônio, quer pela raridade de grânulos, liberação rápida do hormônio pelas células ou por produção de substância não reconhecida pelo anticorpo.

ADENOMA DE CÉLULAS "NULL" OU NÃO IMUNORREATIVOS

Aproximadamente 19% dos adenomas mostram ausência de evidências clínicas de hiperfunção hipofisária, assim como, a ausência de imunoexpressão dos hormônios hipofisários ou alterações específicas de diferenciação ultra-estruturais. Estes tumores são designados de adenomas de células "null". Este termo é preferível, atualmente ao termo anterior de "adenoma de células indiferenciadas", porque implicava em anaplasia em adição à ausência de diferenciação específica. Estes tumores são conhecidos por não produzir nenhum hormônio, mas é improvável que sejam inativos metabolicamente ou que representem um grupo homogêneo. Estes adenomas são classificados em não-oncocíticos e em oncocíticos, dependendo do conteúdo de mitocôndrias da célula.

Pela histologia, os adenomas de células "null" não oncocítico pertence ao grupo de adenomas cromófbos, que não podem ser distinguidos com certeza de outras formas de adenomas esparsamente granulados.

Os adenomas de células "null" oncocíticos eram classificados como adenomas acidofílicos no passado. A coloração pelo P.A.S. é negativa em ambos os grupos. A distinção entre os grupos é feita através de estudo imuno-histoquímico, que demonstra ausência de produção hormonal ou a presença de raras células mostrando positividade para diferentes hormônios hipofisários, especialmente TSH, FSH, LH, ou subunidade alfa.

ADENOMA PLURI-HORMONAL

Os adenomas pluri-hormonais correspondem a aproximadamente 10% dos adenomas hipofisários e podem ser monomórficos ou polimórficos. Os adenomas plurihormonais monomórficos consistem de um tipo de célula morfologicamente, que não pode, na maioria das vezes ser classificada.

Os adenomas polimórficos compreendem células de GH, células mamotróficas e células com características de células produtoras de hormônios glicoproteicos.

A melhor compreensão da citogênese, comportamento biológico e importância clínica destes tumores requer maiores estudos.

Adenomas hipofisários invasivos

Os adenomas pituitários invasivos são tumores de células adenohipofisárias que representam a forma intermediária entre adenomas bem demarcados e os carcinomas hipofisários metastatisante. As estruturas vizinhas mais frequentes invadidas são dura, osso, estruturas venosas, nervos cranianos e sinus. Histologicamente, não há diferença entre lesões benignas, invasivas e malignas dos tumores adeno-hipofisários.

Carcinoma hipofisário

Neoplasias malignas raras, os carcinomas hipofisários geralmente apresentam crescimento rápido e podem invadir estruturas vizinhas, inclusive nervos cranianos e parênquima cerebral, enviando também metástases à distância. Podem produzir ACTH, GH e prolactina, com manifestações endócrinas, ou apresentar-se "silenciosos". Dos 15 casos relatados ⁽⁴⁾, 7 eram produtores de ACTH, 7 de prolactina, sendo um não-funcionante.

Os critérios histológicos, como hiperplasticidade, pleomorfismo nuclear, mitoses, necrose, hemorragia ou invasão não são considerados suficientes para sua diferenciação com os adenomas hipofisários invasivos.

Os estudos de cinética celular realizados ⁽⁵⁾ revelam que o índice de PCNA auxilia a prever a recidiva de adenomas hipofisários. Recente estudamos um caso de carcinoma hipofisário produtor de ACTH, com índice de PCNA de 6% no espécime cirúrgico hipofisário e de 10% na metástase hepática. Em comparação, os adenomas hipofisários ACTH invasivos tiveram índice de PCNA de $3,4 \pm 1,9\%$ enquanto não-invasivos mostraram PCNA em $1,7 \pm 1,5\%$ das células. Nos demais subtipos hormonais de adenomas, o índice foi de $2,9 \pm 1,5\%$ nos invasivos e $1,5 \pm 1,3\%$ nos não-invasivos ⁽⁶⁾.

Tumorigenese

A maioria dos adenomas hipofisários são proliferações monoclonais. Mutações somáticas envolvendo genes que governam proliferação celular em produção hormonal tem sido difíceis de serem identificadas. A etiologia genética da maioria dos adenomas hipofisários é ainda desconhecida ⁽⁷⁾.

Os adenomas hipofisários podem ser desenvolvidos de forma esporádica ou como parte da neoplasia endócrina múltipla tipo I (MEN-I). Recentemente, o gene responsável pelo MEN I foram encontrados em um subgrupo pequeno de adenomas hipofisários esporádicos ^(7,8).

Estudando a patogênese molecular de tumores hipofisários ⁽⁹⁾ confirmaram que o traço autossômico dominante do MEN I está presente em uma minoria dos tumores de hipófise (perda do material genético no cromossoma 11q13), e que há pouco progresso na elucidação das anormalidades celulares genéticas intrínsecas na tumorigênese hipofisária.

Mutação da subunidade alfa do gene Gs (Gsp) foi descrita em uma pequena porcentagem de adenomas somatotróficos ^(10,11).

Eventos raros, relatados por diversos pesquisadores, em adenomas de hipófise, incluem presença do oncogene ras ^(12,13), do gene supressor tumoral p53 ^(13,14), ou da proteína quinase C ⁽¹⁵⁾ e relatos da perda de heterogenidade do gene do retinoblastoma – Rb ^(16,17,18) ou do locus do gene da neoplasia endócrina múltipla tipo I ⁽¹⁹⁾, além da substituição de uma base da proteína Gs em adenomas somatotróficos raros ^(10,11,20).

Por outro lado, a hipófise é local de síntese e de ação de vários fatores de crescimento que representam candidatos potenciais na tumorigênese hipofisária ⁽²¹⁾.

Fatores de crescimento como o EGF, o TGF- α e o bFGF ^(21,22) modulam a produção de hormônios e provavelmente estão envolvidos no controle do crescimento de células hipofisárias.

Foi demonstrada a presença de IGF-1⁽²³⁾, de TGF- α , EGF e de EGF-R^(24,25) em diferentes subtipos de adenomas hipofisários.

Mais relevante é demonstração de mRNA do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) correlacionando-se com a recorrência tumoral⁽²⁵⁾.

Outros autores⁽²⁶⁾, ao estudarem 54 tumores hipofisários, detectaram expressão de c-erbB-2 nos tumores não funcionantes, na metade dos produtores de GH e Prolactina e não demonstraram em adenomas corticotróficos. Mais importante ainda, foi a não correlação da expressão de c-erbB-2 com parâmetros clínicos.

⁽²⁷⁾ Detectaram a expressão de c-erbB-2 no citoplasma de células hipofisárias normais (10 casos) em adenomas hipofisários (16 casos). A expressão da proteína foi examinada do ponto de vista imuno-histoquímico, expressão de RNA mensageiro por RT-PCR e PCR competitivo, amplificação gênica por PCR diferencial e mutações, por sequenciamento de DNA. Foi demonstrada positividade intra-citoplasmática em raras células não tumorais com a utilização de anticorpo contra a porção intracelular, porém com a utilização da porção extracelular, não houve imunoexpressão de membrana. Não houve diferenças entre a hipófise normal e adenomatosa com relação a expressão do RNA mensageiro.

Estudamos a imunoexpressão do c-erbB-2 em 344 adenomas hipofisários sob diversos aspectos⁽²⁸⁾. De todas as neoplasias analisadas, detectamos, através da imuno-histoquímica, com o uso de anticorpo contra a porção extracelular do receptor c-erbB-2, a presença de células tumorais com imunoexpressão em membrana em um único caso. O diagnóstico desse caso de carcinoma hipofisário com metástases hepáticas, apresentando imunoexpressão de c-erbB-2 em membranas de células neoplásicas. Nos outros casos, houve imunoexpressão citoplasmática de c-erbB-2 em 41 adenomas (2 prolactinomas, 2 adenomas somatotróficos, 8 adenomas mistos GH/PRL, 6 adenomas pluri-hormonais, 8 adenomas de células NULL, 8 adenomas gonadotróficos e 7 corticotróficos).

Craniofaringeomas

Os craniofaringeomas são freqüentemente diagnosticados em crianças e adultos jovens, com pico de incidência na segunda década. Ocorrem na região da sela túrcica, sendo freqüentemente supraselares. Constituem de 3 a 5% das neoplasias intracranianas, sendo o segundo tipo tumoral mais freqüente nesta região^(29,30). Além dos sintomas mais comuns encontrados em pacientes portadores de craniofaringeomas, como cefaléia e alterações visuais, podem ocorrer graus variáveis de deficiência hormonal em 32% dos casos e diabetes insipidus em 6% dos casos⁽³⁰⁾.

Macroscopicamente, os craniofaringeomas podem variar em tamanho, forma, consistência, podendo ter áreas sólidas e áreas císticas. Microscopicamente, os craniofaringeomas são compostos por uma variedade de células epiteliais consideradas derivadas de restos embrionários da bolsa de Rathke^(29,30,31). As células epiteliais formam ninhos ou trabéculas e/ou cistos revestidos por epitélio embebido em tecido conjuntivo frouxo ou estroma glial. As células epiteliais formam dois padrões distintos. Há ninhos sólidos de células escamosas formando pérolas escamosas e/ou queratinização estratificada, com a presença de grânulos queratohialinos.

O mais recente subtipo descrito de craniofaringeoma, o craniofaringeoma papilífero, ocorre quase exclusivamente em adultos, mostrando-se geralmente sólido, sem calcificação, apresentam epitélio escamoso papilífero, com células em paliçada e nódulos

queratóides, colesterol ou células gigantes. Em nossa experiência de 43 casos, encontramos somente os craniofaringeomas clássicos, com padrões epidermóide e adamantinomatoso.

Coloração imuno-histológica para citoqueratinas nos craniofaringeomas clássicos demonstra positividade difusa no epitélio adamantinomatoso (células basais e estrelares), mais intenso nas células suprabasais das cordas de anastomoses. Nas regiões císticas, o epitélio achatado cora-se para citoqueratinas. Em nódulos queratóticos as células coram-se intensamente, alternando-se com células não coradas. A vimentina é demonstrada nas células do estroma e nas células endoteliais.

Metástases para a hipófise

As neoplasias metastáticas ocorrem primeiramente no lobo posterior e haste hipofisária e disseminam-se para o lobo anterior via vasos portais. Metástases em região selar ocorrem em 1 a 3% dos pacientes com neoplasias malignas. As metástases hipofisárias raramente causam sintomatologia por disfunção endócrina. Os tumores primários que mais frequentemente metastatizam para a região hipofisária são os de mama, brônquios, cólon, próstata e melanoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Horvath E, Kovacs K. Identification and classification of pituitary tumors. In: Recent Advances in Neuropathology. Ed. Cavanager, J.B, n. 3, Churchill Livingstone, NY, 1986; p 75-93.
2. Kovacs K, Horvath E. Tumors of the pituitary gland. In Atlas of Tumor Pathology, Series 2, Vol. 21. Washington, Armed Forces Institute of Pathology 1986.
3. Kovacs K, Scheithauer BW, Horvath E, Lloyd RV. The World Health Organization Classification of Adenohypophysial Neoplasms: A proposed five-tier Scheme. *Cancer* 1996; 78:502-510.
4. Pernicone PJ, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Young WF, Lloyd RV, Daris DH, Guthrie BL, Schoene WC. Pituitary carcinoma: A clinicopathologic study of 15 cases. *Cancer* 1997; 79:804-812.
5. Hsu DW, Hakim F, Biller BMK, de la Monte S, Zervas NT, Klibanski A, Hedley Whyte ET. Significance of proliferating nuclear antigen index in predicting pituitary adenoma recurrence. *J. Neurosurg.* 1993; 78:753-761.
6. Nosé V, Kayath M, Alberti GN. Pituitary adenomas and PCNA index: an analysis of biological aggressiveness in different immunohistological subtypes. *End. Pathol.* 1998; 9(4):420-1.
7. Zhuang Z, Ezzat SZ, Vortmeyer AO, Weil R, Oldfield EH, Park WS, Pack S, Huang S, Agaswal SK, Guru SC, MANICKAM P, Debelenko LV, Kester MB, Olufemi SE, Heppner C, Crabtree JS, Burns AL, Spiegel AM, Marx SJ, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Asa SL, Lubensky IA. Mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in pituitary tumors. *Cancer Res.* 1997; 15(24):5446-51.
8. Asa SL, Somers K, Ezzat S. The MEN-1 gene is rarely down-regulated in pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998, 83(9):3210-2.
9. Herman-Bonert, V, Fagin JÁ. Molecular pathogenesis of pituitary tumours. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1995, 9:203-23.
10. Vallar L, Spada A, Giannattasio G. Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature (London)* 1987; 330:566-568.
11. Tordjman K, Stern N, Quaknine G, Yossiphov Y, Razon N, Nordenskjold M, Friedman E. Activating mutations of the Gs α -gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77:765-769.
12. Karga HJ, Alexander KM, Hedley-White ET, Klibanski A, Jameson JL. Ras mutations in human pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 74:914-9.
13. Herman V, Drazin NZ, Gonsky R, Melmed S. Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77:50-55.
14. Sumi T, Stefanescu L, Kovacs K, Asa SL, Rindi G. Immunohistochemical study of p53 protein in human and animal pituitary tumors. *Endoc. Pathol.* 1993; 4:95-99.
15. Alvaro V, Levy L, Dubray C, Roche A, Peillon F, Quérat B, Joubert D. Invasive human pituitary tumours express a point-mutated α -protein kinase-C. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993, 77:1125-1129.
16. Cryns VL, Alexander JM, Klibanski A, Arnol A. The retinoblastoma gene in human pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993, 77:644-646.
17. Zhu J, Leon SP, Beggs AH, Busque L, Gilliland DG, Black PM. Human pituitary adenomas show no loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene locus. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1994; 78:922-927.
18. Woloschak M, Roberts JL, Post KD. Loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human pituitary tumors. *Cancer (Philadelphia)* 1994; 74:693-696.
19. Bystrom C, Larsson C, Blomberg C, Sandelin K, Falkmer E. Localization of the MEN-1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumours. *Proc. Natl. Acad. Sciences USA* 1990, 87:1968-1972.
20. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünewald K, Feichtinger H, Duh Q-Y, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR, McCormick F. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* 1990; 249:655-659.
21. Ezzat S, Melmed S. The role of Growth factors in the pituitary. *J. Endocrinol. Invest.* 1990, 13:691-698.

22. Webster J, Ham J, Bevan JS, Scanlon MF. Growth factors and pituitary tumors. *Trends Endocrinol. Metabol.* 1989; 1:95-98.
23. Nosé-Alberti V, Takita LC, de Mesquita MI, et al. Immunohistochemical demonstration of insulin-like growth factor I (IGF-I) in normal and pathological human pituitary glands. *Pathol. Res. Pract.* 1991; 187:541-2
24. Ezzat S, Walpola IA, Ramyar L, Smyth HS, Asa SL. Membrane-anchored expression of transforming growth factor- α in human pituitary adenoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80:534-539.
25. LeRiche V, Asa SL, Ezzat, S. Epidermal growth factor and its receptor (EGF-R) in human pituitary adenomas: EGF-R correlates with tumor aggressiveness. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1996; 81:656-662.
26. Chaidarun SS, Eggo MC, Sheppard MC, Stewart PM. Expression of epidermal growth factor (EGF), its receptor, and related oncoprotein (erbB-2) in human pituitary tumors and response to EGF in vitro. *Endocrinol.* 1994, 135:2012-2021.
27. Ezzat S, Zheng L, Smyth HS, Asa SL. The c-erbB-2/neu proto-oncogene in human pituitary tumours. *Clin. Endocrinol.* 1997, 46:599-606.
28. Nosé-Alberti V, Mesquita MIS, Martin LC, Kayath MJ. Adrenocorticotropin-Producing Pituitary Carcinoma with Expression of c-erbB-2 and High PCNA Index: A Comparative Study with Pituitary Adenomas and Normal Pituitary Tissues. *Endocrine Pathology*, 1998; 9:53-62.
29. Banna M. Craniopharyngioma: based on 160 cases. *Br. J. Radiol.* 1976, 49:206-223.
30. Petito CK, De Girolami U, Earle KM. Craniopharyngiomas. *Cancer* 1976; 37: 1944-52.
31. Liszezak KT, Richardson Jr EP, Phillips JP, Jacobson S, Kornblith PL. Morphological, biochemical, ultrastructural, tissue culture and clinical observation of typical and aggressive craniopharyngiomas. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1978; 43:191-203.
32. Green VL, White MC, Hipkin LJ, Jeffreys RV, Foy PM, Atkin SL. Apoptosis and p53 suppressor gene protein expression in human anterior pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 1997, 136:382-387.
33. Horvath E, Kovacs K. Pathology of the pituitary gland. In: Ezrin C, Horvath E, Kaufman B, Kovacs K, Weiss MH (eds). *Pituitary diseases*, CRC Press, Boca Raton 1980; p 1-83.
34. Kayath MJ, Martin LC, Vieira JGH, Roman LM, Nosé V. "C-erb-2 immunoexpression in parathyroid tumors and hyperplasias". *End. Pathol.* 1999; 10:1-8.
35. Lloyd RV. *Surgical Pathology of the Pituitary Gland*. Ed. Lloyd, Ricardo V. 1st ed. W.B. Saunders Co, 1993.
36. Lloyd RV. *Molecular biological Analysis of Pituitary Disorders*. In: *Surgical Pathology of the Pituitary Gland*. Ed. Lloyd, Ricardo V, 1st ed. WB Saunders Co, 1993; p 85-93
37. Ray D, Melmed S. Pituitary Cytokine and Growth Factor Expression and Action. *Endocrine Reviews* 1997; 18:206-228.
38. Sanno N, Osamura RY. Molecular Pathology of the Pituitary Adenoma. *Endocr. Pathol.* 1997; 8:137-142.
39. Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER, et al. Pathology of invasive pituitary adenomas with special reference to functional classification. *J. Neurosurg.* 1986; 65:733-44.
40. Stefaneanu L, Kovacs K. Light microscopic special stains and immunochemistry in the diagnosis of pituitary adenomas. In: *Surgical Pathology of the Pituitary Gland*. Ed. Lloyd, Ricardo V, 1st ed. WB Saunders Co. 1993; p 34-51
41. Thapar K, Kovacs K, Laws Jr ER, Muller PJ. Pituitary Adenomas: Current Concepts in Classification, Histopathology, and Molecular Biology. *The Endocrinologist* 1993; 3:39-57.
42. Trouillas J, Girod C. Pathology of Pituitary Adenomas. In: *Pituitary Adenomas*. Edited by Landolt, A.M, Vance, M.L, Reilly, P.L. Churchill Livingstone Inc, New York 1996; p 27-46.
43. Yamada S, Stefaneanu L, Kovacs K. Immunocytochemistry of Pituitary Tumors. *Diagn. Oncol.* 1991; 1:218-230.

TIREÓIDE

Inúmeras substâncias podem ser detectadas por imuno-histoquímica em células tireoideanas normais e suas neoplasias.

Os marcadores mais comumente utilizados em diagnóstico são a tireoglobulina para células foliculares e calcitonina para as células C da tireóide. Os marcadores de prognóstico para carcinoma medular de tireóide são a calcitonina e o antígeno carcinoembrionário e a diferenciação de tumores foliculares pode ser feita com o uso de anticorpos anti-citoqueratina de pesos moleculares diversos.

1. Células foliculares

Os produtos de células foliculares identificados por imuno-histoquímica são a tireoglobulina, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). As glândulas normais mostram variação de imunocoloração nos diferentes folículos, sendo que as células ativas cuboidais e o colóide intraluminal demonstram intensa imunopositividade de tireoglobulina, T4 e T3. Já os folículos dilatados, repletos de colóide, revestidos por células achatadas, inativas, mostram-se negativos ou palidamente coradas.

Em glândulas tireoideanas com bócio colóide e doença de Graves, há intensa imunopositividade em células foliculares hiperplásicas e no colóide. Os adenomas foliculares mostram grande variação no padrão de imunopositividade de tireoglobulina.

- Adenomas hiperativos e hiperfuncionantes têm imunopositividade para tireoglobulina mais intensa do que os adenomas hipofuncionantes.
- Os adenomas tipo macrofoliculares com células foliculares achatadas, são frequentemente negativos para tireoglobulina, podendo ter imunopositividade focal em áreas com células cuboidais e no colóide.
- Os adenomas oncocíticos, ricos em mitocôndria, exibem padrão de imunopositividade globular para tireoglobulina, no ápice das células foliculares.
- Os adenomas de células claras exibem padrão em pontilhado focal em células foliculares.

Estudos bioquímicos e histoquímicos demonstram que a tireoglobulina produzida por neoplasias tireoideanas difere da produzida por glândulas normais.

Em carcinomas da tireóide derivados do epitélio folicular, há concordância de que os tumores mais diferenciados expressam mais intensamente a tireoglobulina do que os menos diferenciados, sendo que os tumores anaplásicos raramente imunopositivam para tireoglobulina, quer em sua forma primária ou em metástases.

Mais de 90% dos carcinomas foliculares e papilíferos da tireóide apresentam imunopositividade para tireoglobulina, assim como as suas metástases. A imunopositividade para tireoglobulina em tumores foliculares e suas metástases tem alta especificidade (99%) e alta sensibilidade (92-95%).

Os carcinomas foliculares imunocoram para tireoglobulina com uma distribuição irregular, com áreas mais imunocoradas do que outras e com células intensamente coradas e células negativas.

Os carcinomas papilíferos apresentam coloração difusa intracitoplasmática e ocasionalmente podem apresentar padrão de tireoglobulina apical ou basal nas células neoplásicas.

Os carcinomas insulares de tireóide (pouco diferenciados) apresentam imunoexpressão de tireoglobulina no colóide e no citoplasma das células neoplásicas, sugerindo que esta neoplasia seja um tipo intermediário entre o carcinoma bem diferenciado e o anaplásico.

A distribuição dos filamentos intermediários nas células foliculares e suas neoplasias tem sido descrita por inúmeros autores. Miettinen et al. ⁽¹⁾ demonstraram a presença de citoqueratinas de alto peso molecular em algumas células foliculares em 8% de tireóides normais, 44% de hiperplasias, e em todos os casos de tireoidite crônica. Todos os casos de carcinoma papilífero imunoexpressaram citoqueratinas de alto peso molecular, assim como a variante folicular dos carcinomas papilíferos. Poucos casos de carcinoma anaplásicos (20%), carcinomas medulares (7%) e carcinomas foliculares (6%) imunocoraram para aquelas citoqueratinas.

Fonseca et al. ⁽²⁾ estudaram 41 carcinomas papilíferos, 10 carcinomas foliculares, 2 carcinomas pouco diferenciados e 34 tireóides normais ou com tireoidite linfocitária, e encontraram imunoexpressão de CK7 em 18 tireóides normais e tireoidites linfocitárias e, em menor expressão demonstraram as CK8 e CK19. Os carcinomas foliculares e papilíferos imunoexpressaram as citoqueratinas do tipo de epitélio simples (CK7, 8, 18 e 19). As citoqueratinas de alto peso molecular, próprias dos tipos de epitélio estratificado (CK 5/6 e 13) foram encontradas somente nos carcinomas papilíferos. Estes achados são concordantes com os de Miettinen et al. ⁽¹⁾.

Schelfhout et al. ⁽³⁾ demonstraram as citoqueratinas 8 a 18 em todas as células foliculares normais, hiperplásicas ou neoplásicas. Todos os carcinomas papilíferos imunocoraram para a citoqueratina 19, e estes autores consideraram essa citoqueratina característica das neoplasias papilíferas, pois em outras lesões, apenas uma pequena porcentagem das células imunoexpressaram a citoqueratina 19.

O epitélio folicular normal, hiperplásico e neoplásico, exibe vimentina apesar de haver variações na freqüência da positividade para vimentina relatada por diferentes autores. O padrão filamentar, na porção basal ou de membrana celular também não diferencia epitélio folicular normal, as tireoidites, e as diversas neoplasias tireoideanas.

O antígeno epitelial de membrana (EMA) está presente nos carcinomas papilíferos, porém foi encontrado focalmente em alterações papilíferas de lesões benignas por Damiani et al. ⁽⁴⁾. Esses autores também demonstraram presença de alcian blue nos carcinomas papilíferos enquanto as papilas benignas não continham alcian blue. CD57 (Leu 7 ou HNK-1), também considerado um marcador neuroendócrino, está presente nos carcinomas foliculares e papilíferos e raramente presente, focal, em lesões benignas.

Fatores de crescimento celular, seus receptores, oncogenes e genes supressores tumorais também têm sido demonstrados em diversas neoplasias tireoideanas, sendo atualmente motivo de debates, existindo correlação com comportamento biológico e como fator prognóstico dessas neoplasias.

2. Células C ou células parafoliculares

As células C da tireóide sintetizam calcitonina e contêm também cromograninas, sinaptofisinas e enolase neurônio específica. Estas células estão localizadas nos folículos tireoideanos, isoladamente ou em pequenos grupos celulares e se concentram principalmente nos terços superior e médio dos lobos direito e esquerdo, sendo escassas no istmo. As células C podem ser identificadas por imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos contra calcitonina e comograninas, e foi através desse método que a sua distribuição foi melhor estudada.

A hiperplasia de células C, também visualizada pela imuno-histoquímica, é caracterizada pelo aumento destas células nos folículos e ao redor destes. As células C hiperplásicas estão separadas do interstício por lâmina basal folicular, sendo que a invasão da membrana basal com células C no interstício já caracteriza o carcinoma medular. Os carcinomas medulares acompanhadas de hiperplasia de células C fazem parte da forma familiar da neoplasia, enquanto que a forma esporádica do carcinoma medular geralmente não apresenta hiperplasia das células C.

Os carcinomas medulares de tireóide são habitualmente pluri-hormonais e imunocoram para calcitonina, antígeno carcinoembrionário (CEA), citoqueratinas de baixo peso molecular, enolase neurônio específica, cromograninas A, B e C e sinaptofisinas. Os outros hormônios que estes tumores podem imunoexpressar incluem ACTH, somatostatina, serotonina, beta-endorfina, peptídeo intestinal vasoativo, hormônio estimulante dos melanócitos (MSH), prostaglandinas, bombesina, histaminase, glucagon, insulina, gonadotrofina coriônica, molécula de adesão de células neurais (N-CAM), entre outros.

A calcitonina e o CEA têm distribuição imuno-histológica semelhante em hiperplasias de célula C e em carcinoma medular restrito à tireóide. Nos carcinomas disseminados há relação inversa entre calcitonina e CEA com aumento de CEA e perda da imunoexpressão para calcitonina. Como regra, as células C com hiperplasia têm maior imunorreatividade para CEA do que as células C normais e maior imunorreatividade para calcitonina do que as células do carcinoma medular. Como indicador de mau prognóstico também, a maior imunorreatividade para CEA e pobre imunocoloração para calcitonina nos carcinomas medulares tem sido encontrado por diversos autores.

A expressão de citoqueratinas de baixo peso molecular pode ser acompanhada da imunoexpressão de vimentina e neurofilamentos.

Os carcinomas medulares são negativos para tireoglobulina e a imunorreação para aquele hormônio identifica normalmente os folículos residuais.

Entretanto, inúmeros casos de carcinomas mistos folicular-medular têm sido relatados, com imunoexpressão de ambos, calcitonina e tireoglobulina na mesma célula.

Kargi et al. ⁽⁵⁾ relataram a presença de diferenciação neuroendócrina em carcinomas papilíferos, foliculares e indiferenciados da tireóide, ao imunocorarem para sinaptofisinas, NSE, cromograninas e calcitonina. Estes autores postulam que uma célula primitiva derivada do endoderma pode dar origem às células C e às células foliculares.

Dobashi et al. ⁽⁶⁾ apontaram que a imunoexpressão de p53 tem papel importante nos subtipos agressivos dos carcinomas de tireóide. Ao estudarem 110 casos de carcinomas de tireóide, encontraram positividade para aquela oncoproteína em 11,1% dos carcinomas papilíferos bem diferenciados, 14,3% dos carcinomas foliculares bem diferenciados, 40,9% dos carcinomas pouco diferenciados e em 63,6% dos carcinomas

indiferenciados. Não encontraram imunopositividade em tireóide normal, em tireoidite, adenoma folicular, ou em bócio.

PARATIREÓIDE

O hiperparatireoidismo (HPT) é uma doença endócrina com alta prevalência (1/1000). Entre as doenças clássicas endócrinas, apenas o diabetes mellitus e o hipertireoidismo são mais freqüentes que o HPT. O hiperparatireoidismo caracteriza-se por hipercalcemia devido ao excesso de secreção do hormônio paratireoideano (PTH), que leva também ao quadro clínico de doença óssea e nefrolitíase. O HPT pode ser subdividido em primário (adenomas, 85%) ou secundário (12-15%, hiperplasias) ou raramente carcinomas (1-2%). Infelizmente, a diferenciação entre adenomas e hiperplasias pelo quadro clínico, bioquímico ou anatomopatológico é difícil.

O PTH pode ser identificado nos grânulos secretórios de células principais normais, hiperplásicas ou neoplásicas por imuno-histoquímica, porém depende do anticorpo utilizado, sendo que o anticorpo bovino é o que produz melhores resultados. A hibridização *in situ*, entretanto, é melhor na identificação de células principais da paratireóide.

A proteína secretora da paratireóide (PSP), idêntica à cromogranina A, é um dímero com 2 subunidades idênticas, tem sido identificada nas células principais por imunofluorescência.

O anticorpo monoclonal anti-paratireóide (E11), descrito por Bjerneroth et al. ⁽⁷⁾ que reage com a glicoproteína de alto peso molecular que age como receptor de cálcio na superfície das células da paratireóide e media os níveis de cálcio através da liberação do PTH, foi considerado como de valor para diferenciar células normais das células com HPT.

A proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP) tem sido detectada em diversas células normais, como as da paratireóide, pele, glândula mamária, placenta e nas hiperplasias e adenomas de paratireóide e em diversas neoplasias associadas com hipercalcemia.

As células principais da paratireóide imuno-reagem para as citoqueratinas números 8, 18 e 19, porém, não expressam as CK de alto peso molecular. Miettien et al. ⁽⁸⁾ não encontraram imunorreação para vimentina, porém encontraram para neurofilamentos em células de 33% dos adenomas de paratireóide.

Vargas et al. ⁽⁹⁾ estudaram 10 adenomas, 10 lesões atípicas e 11 carcinomas de paratireóide para identificar o papel diagnóstico e prognóstico do antígeno Ki-67 pelo anticorpo MIB-1, p53, RB e bcl-2 por imuno-histoquímica. A conclusão daqueles autores é de que o p53 e o bcl-2 não foram úteis no diagnóstico diferencial de lesões benignas das malignas enquanto que o índice do antígeno Ki-67 maior do que 40% correlaciona-se com neoplasia maligna e que RB negativo tende a excluir lesões benignas.

Anormalidades genéticas em Tumores Paratireoideanos

a) Ciclina D1/PRAD1 (Paratireóide Adenoma 1)

Vários oncogenes humanos foram descobertos por estarem adjacentes a quebras cromossômicas em tumores. Frequentemente, estes rearranjos cromossômicos levam a expressão desregulada de um protooncogene, convertendo-o em oncogene. O gene

PRAD1 e a proteína ciclina D1 por ele codificada foram os primeiros a ser convincentemente incriminados na tumorigênese da paratireóide. O PRAD1 é um protooncogene localizado no braço longo do cromossoma 11 e seu produto protéico ciclina D1, de 295 aminoácidos é um regulador do ciclo celular na fase G1. A amplificação do gene da ciclina D1 têm sido implicado na patogênese de inúmeras neoplasias como linfomas centrocíticos (praticamente 100% dos casos), neoplasias de mama (81%), tumores de células escamosas (30-35%), de esôfago (35%) e alguns casos de neoplasias de bexiga, hepatocelular, pulmão e pele. Arnold et al. ⁽¹⁰⁾ estudaram a expressão da ciclina D1 em 65 adenomas de paratireóide e encontraram um aumento desta proteína em aproximadamente 20% dos casos. Além deste achado, neste mesmo trabalho, dois dentre os três casos de carcinomas de paratireóide, apresentavam aumento da expressão da ciclina D1. Os autores concluem que esta proteína possa exercer papel importante na gênese de tumores paratireoideanos, particularmente em carcinomas.

O aumento da expressão deste gene se deve a uma inversão no braço curto do cromossoma 11, criado por uma quebra na vizinhança do gene do PTH. Após a quebra, há rotação da porção central do cromossoma usando o centrômetro como eixo de religação ao cromossoma posteriormente. Esta inversão cromossômica leva a justaposição da região regulatória do gene do PTH ao oncogene ciclina D1/PRAD1. O resultado deste rearranjo seria o aumento da expressão do oncogene, que é um regulador do ciclo celular e presumivelmente um incremento da proliferação celular.

b) p53 e RB

Em carcinomas de paratireóide anormalidades de genes supressores de tumores como o p53 e RB foram encontrados. As anormalidades no p53 têm sido descritas numa minoria dos casos de carcinomas paratireoideanos (30%). Existe nestes casos um aumento da expressão desta proteína detectada por imuno-histoquímica e perda de um alelo do gene do p53 detectados por exames de polimorfismo do DNA. Estas últimas alterações haviam sido descritas como específicas para carcinomas, porém têm sido encontradas em séries de adenomas de paratireóide e a expressão de p53 em hiperplasias paratireoideanas foi encontrada em nossa casuística.

Estudamos a expressão de p53 em 49 glândulas da paratireóide em pacientes urêmicos com hiperparatireoidismo refratário. A hiperplasia nodular foi o achado predominante em 77,5% das glândulas, com maior proporção de células oxifílicas e arranjos celulares neste grupo. Não houve correlação entre PTH sérico, cálcio e padrão de hiperplasia. Houve imunorreatividade nuclear de p53 em 55% das glândulas hiperplásicas, sendo tal reação negativa nas 12 glândulas normais utilizadas como controle. Nossos resultados sugeriram que a expressão do p53 pode estar envolvida em hiperplasias de paratireóide.

A inativação do gene RB foi descrita como uma alteração freqüente em carcinomas em uma série de 19 adenomas e 9 carcinomas ⁽¹¹⁾. Esses autores descreveram uma perda de um alelo do gene RB em 100% dos casos de carcinoma estudados, levando à anormalidade da expressão desta proteína por imuno-histoquímica. Estes achados não foram encontrados em nenhum adenoma estudado. Portanto, o gene RB parece estar ligado à gênese de carcinomas de paratireóide, mas não de adenomas. Sua expressão em hiperplasias paratireoideanas é desconhecido. Curiosamente, é sabido que a ciclina D1 é um fator regulador da função da proteína RB, inativando-a por induzir fosforilação da mesma. Este achado sugere um mecanismo gênico interligado na formação destes tumores.

Estudamos ⁽¹²⁾ a imunexpressão de c-erbB-2 em 102 tumores e hiperplasias de paratireóide (28 adenomas, 12 hiperplasias primárias, 57 hiperplasias secundárias e 5 carcinomas). Observamos que houve imuno-deteccção do oncogene em membranas nos 515 casos de carcinomas, em 50% dos adenomas e estava ausente em paratireóide normal. Encontramos também imunexpressão de c-erbB-2 em alguns casos de hiperplasia, indicando que o c-erbB-2 pode ser um fator no desenvolvimento e manutenção da proliferação.

Como vemos em outros órgãos, também a tumorigênese paratireoideana decorre de alterações de múltiplos genes.

PÂNCREAS ENDÓCRINO

As ilhotas pancreáticas são formadas por células arredondadas ou poligonais separadas por capilares sanguíneos e separadas do pâncreas exócrino por tecido conjuntivo. Existem ao redor de 1.000.000 ilhotas no pâncreas, correspondendo a 1,5% do volume pancreático.

Por imuno-histoquímica, as células pancreáticas são separadas de acordo com a produção hormonal e as principais células são:

1. Células beta, produtoras de insulina, que constituem 60 a 80% das células das ilhotas, sendo pequenas, cromóforas à coloração de rotina, por conterem grânulos irregulares, esparsos.
2. Células alfa, produtoras de glucagon, são menos freqüentes, correspondem a 15 a 20% das células das ilhotas e estão localizadas preferencialmente na periferia.
3. Células delta, produtoras de somatostatina correspondem de 5 a 15% do total das células endócrinas.
4. Células PP, produtoras do polipeptídeo pancreático, estão localizadas preferencialmente na cabeça do pâncreas e correspondem a menos de 2% das células das ilhotas.
5. Outros tipos celulares produtores de vários outros hormônios, entre eles células enterocromafínicas, produtoras de serotonina, células produtoras de peptídeo intestinal vasoativo, gastrina, etc.
6. Células endócrinas presentes em localizações extra-ilhotas, principalmente em ductos pancreáticos.

As células endócrinas do pâncreas coram-se para marcadores endócrinos genéricos, como as cromograninas, enolase neurônio-específica, sinaptofisinas e neurofilamentos, além dos marcadores hormonais específicos para cada célula.

IMUNO-HISTOQUÍMICA EM NEOPLASIAS DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

Os tumores endócrinos do pâncreas correspondem a uma pequena fração de todos os tumores pancreáticos. A maioria ocorre em adultos e a localização mais comum é no corpo e cauda do pâncreas.

O aspecto histológico é dividido de acordo com o padrão de crescimento em sólido, glandular e cribiforme, muitas vezes relacionado com o tipo celular endócrino. O

aspecto cribiforme geralmente é formado por células alfa ou beta e o glandular por células G ou VIP.

O estroma pode ser hialino ou com material amilóide, principalmente nos tumores produtores de insulina. O polipeptídeo amilóide das ilhotas (IAPP) pode ser detectado por imuno-histoquímica.

A maioria dos tumores de ilhotas produz síndrome endócrina decorrente da secreção de um ou mais hormônios. Alguns tumores podem ser não funcionantes.

Estudos imuno-histoquímicos de tumores das ilhotas pancreáticas demonstraram que os tumores pluri-hormonais são comuns e que podem ocorrer em uma variedade de formas:

1. Vários tipos celulares como tumor único,
2. Vários tumores, com tipos celulares diversos,
3. Vários tumores, sendo cada um com vários tipos celulares.

Podem ser encontrados diversos hormônios na mesma célula e até no mesmo grânulo secretório. A célula predominante, com a produção hormonal principal que produz síndrome clínica, é a que denomina a neoplasia.

As colorações de rotina permitem identificar o tumor pancreático como sendo de origem endócrina, porém para melhor caracterizar a neoplasia, a imuno-histoquímica se faz indispensável.

Como marcadores genéricos, essas neoplasias imunoexpressam enolase neurônio específica, cromograninas A e B, sinaptofisinas, neurofilamentos, alfa-1-antitripsina, pre-albumina, entre outros. Dos hormônios identificados nos tumores de ilhotas, os principais são insulina, glucagon, somatostatina, polipeptídeo pancreático, gastrina, peptídeo intestinal vasoativo, ACTH, ADH, MSH, Calcitonina, neurotensina, PTH, GH, GHRF e sub unidade alfa do HCG

A caracterização precisa do fenótipo imuno-histoquímico dos tumores endócrinos do pâncreas é importante porque:

1. A produção hormonal principal correlaciona-se com o potencial metastático da neoplasia: os insulinomas são malignos em apenas 5 a 10% dos casos, os glucagonomas são malignos ao redor de 60% e os gastrinomas, VIPomas e SRIFoma são malignos em aproximadamente 75% dos casos, enquanto os carcinóides produtores de serotonina são, na sua grande maioria, malignos.
2. Em tumores não funcionantes clinicamente, o estudo imuno-histoquímico pode ser o único dado funcional da neoplasia, indicando produção hormonal.
3. Uma grande proporção de tumores de ilhotas pancreáticas mostra-se pluri-hormonal e os sintomas de superprodução de um hormônio podem mascarar os sintomas do outro hormônio.

Neoplasias endócrinas pancreáticas específicas

1. Insulinomas ou tumores de células beta

Ocorrem em ambos os sexos, principalmente em adultos, sendo os tumores mais comuns e melhor estudados. Menos de 10% dos pacientes são parte da síndrome endócrina múltipla tipo I (MEN I).

A tríade característica desta neoplasia é:

- Confusão mental, fraqueza, cansaço, convulsões
- Glicemia abaixo de 50 mg/dl
- Melhoria dos sintomas após administração de glicose.

Os insulinomas são solitários a este mais de 90% dos casos, pequenos, com 70% medindo menos do que 1,5 cm. Estão localizados no pâncreas e raramente em parede duodenal.

Microscopicamente, estes tumores são sólidos ou podem ter aspecto cribiforme. Imunoreagem fracamente para cromograninas e coram uniformemente para insulina, de maneira menos intensa do que as células beta normais. A metade dos casos pode, também, corar para pró-insulina.

Os insulinomas bem diferenciados (tipos 1 e 2), mostram coloração uniforme e difusa para insulina, enquanto os tumores menos diferenciados (tipos 3 e 4) mostram reação focal e fraca para esse hormônio.

O aspecto histológico não diferencia insulinomas benignos do malignos, sendo estes últimos só diagnosticados por infiltração a tecidos adjacentes ou metástases. Somente 6-10% dos insulinomas são malignos.

Todos os 10 casos de insulinoma diagnosticados em nosso serviço, exibiram imunexpressão para cromograninas e insulina. Somente 1 caso foi mono-hormonal, sendo que 9 casos produziam 2 ou mais hormônios, conforme exposto na Tabela 1.

Caso	Idade/ Sexo	Cromogranina	Insulina	Glucagon	Gastrina	Somatostatina
1	65 a/F	+	+	-	-	+
2	65 a/F	+	+	-	-	+
3	30 a/M	+	+	-	+	+
4	17 a/M	+	+	+	+	+
5	49 a/F	+	+	-	-	+
6	65 a/M	+	+	+	+	+
7	36 a/F	+	+	-	-	-
8	61 a/M	+	+	-	+	+
9	45 a/M	+	+	+	+	+
10	74 a/F	+	+	-	+	+

2. Glucagonomas ou tumores de células alfa

Os glucagonomas podem ser divididos em dois tipos distintos. Um, associado com a síndrome do glucagonoma, normalmente são tumores únicos e grandes, com padrão microscópico indistinto, pouca imunorreatividade para glucagon e alta incidência de malignidade (60% dos casos).

Os glucagonomas não associados à síndrome do glucagonoma, normalmente são pequenos e múltiplos, com padrão cribiforme de crescimento e são imunorreativos uniformemente com grande intensidade para glucagon, pois tem grânulos típicos das células alfa à M.E. Estes tumores são geralmente benignos.

3. Gastrinomas ou tumores das células G

Estes tumores, que podem estar localizados no pâncreas, parede duodenal ou antro gástrico, produzem a Síndrome de Zollinger-Ellison, devido à produção excessiva de gastrina. A síndrome é caracterizada por aumento da acidez gástrica com úlceras gástricas, duodenais e jejunais, acompanhado de diarreia.

Os tumores esporádicos produtores de gastrina, associados com a Síndrome de Zollinger-Ellison, são solitários no pâncreas ou na parede duodenal e são freqüentemente malignos. Os tumores associados com a Síndrome da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo I (MEN-I) são multicêntricos, localizados principalmente na parede duodenal e são mais raramente malignos do que os da forma esporádica.

Do ponto de vista histológico, os gastrinomas têm padrão de crescimento sólido ou glandular e, à imuno-histoquímica, as células neoplásicas imunocoram para gastrina. O pâncreas não neoplásico nos pacientes com gastrinoma apresenta hiperplasia das diversas células das ilhotas pancreáticas.

Perkins e cols, 1992, ao estudarem 25 gastrinomas encontraram imunopositividade para gastrina em todos os tumores e 24 deles apresentaram hibridização para mRNA da gastrina positivo. Demonstraram também que só os gastrinomas malignos imunocoram para ACTH.

4. VIPomas ou tumores produtores de VIP

Estes tumores estão associados com a síndrome clínica de diarreia na ausência de hipersecreção gástrica. As características morfológicas e ultra-estruturais são semelhantes aos gastrinomas, porém, por imuno-histoquímica, há demonstração do polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e ausência de gastrina. Alguns tumores também contêm polipeptídeo pancreático, calcitonina e subunidade alfa do HCG

5. Somatostatatomas ou tumores de células delta

Estes tumores apresentam-se clinicamente como não funcionantes ou o paciente pode apresentar-se com diabetes, colelitíase, esteatorréia, hipocloridria e anemia. A maioria destes tumores está localizada no pâncreas, porém alguns podem estar localizados na parede duodenal. A imunorreatividade para somatostatina pelas células tumorais é difusa, porém fraca.

6. Tumores de células PP (Polipeptídeo pancreático)

Estes tumores são raros, somente recebendo tal denominação se formados, em sua maioria, por células produtoras de PP. Uma grande parte dos outros tumores de ilhotas pancreáticas pode ter uma pequena proporção de células imunorreativas para este hormônio.

ADRENAL

As doenças da adrenal estão associadas com uma variedade de síndromes clínicas, resultado de anormalidades de produção e secreção de diversos hormônios e catecolaminas. Os critérios macroscópicos e microscópicos das neoplasias de adrenal são insuficientes para o diagnóstico definitivo, devendo-se levar em consideração dados clínicos e laboratoriais, microscopia eletrônica, imuno-histoquímica, citometria de fluxo, biologia molecular e bioquímica.

A córtex adrenal é de origem mesodérmica, enquanto que a medula é derivada da crista neural ectodérmica. Por imuno-histoquímica, as células da medula adrenal contêm enolase neurônio específica, sinaptofisinas, cromograninas e peptídeos reguladores, além de catecolaminas e enzimas sintetizadoras de catecolaminas. As células da córtex adrenal imunoreagem focalmente para citoqueratinas 8 e 18 (CAM 5.2 e 35BH11) e vimentina.

Tumores da córtex adrenal

Os adenomas e carcinomas da córtex adrenal podem ter diferenças importantes na frequência de positividade para citoqueratinas, dependendo da especificidade dos anticorpos utilizados e do tipo de preparo do tecido. A fixação do tecido por formol 10%, mesmo tamponado e embebido em parafina, leva a resultados negativos para citoqueratinas em adenomas ou carcinomas. Vários tipos de citoqueratinas testados por diversos autores em tecido assim fixados, tem sido ausentes nos tumores por imuno-histoquímica. Entretanto, em tecidos frescos congelados e fixados em álcool, 60% dos carcinomas de adrenal imunoreagem para citoqueratina 8 (CAM 5.2) e citoqueratina 18 (CK2/CK18).

Vimentina está presente na maioria dos carcinomas de adrenal, quer em tecido fresco congelado ou em tecido fixado em formol, parafinizado e tripsinizado⁽¹³⁾. Estudos⁽¹⁴⁾ demonstraram também que os carcinomas de córtex adrenal podem ter diferenciação neuroendócrina, com imunoreatividade para enolase neuronio específica, neurofilamentos, proteína S-100 e sinaptofisinas. Naqueles estudos, o autor encontrou 8/10 casos positivos para sinaptofisina, 6/10 casos positivos para neurofilamento de 68KD e 6/10 casos positivos para NSE, enquanto a adrenal normal era negativa para estes marcadores. Estes achados sugerem que carcinomas de adrenal com diferenciação neuroendócrina podem originar de célula primitiva com diferenciação multidirecional.

Além do diagnóstico anatomopatológico difícil entre adenomas e carcinomas, sendo necessário a utilização de diversos critérios para o diagnóstico diferencial destas neoplasias originárias da córtex adrenal, o diagnóstico diferencial com outras neoplasias é difícil.

A diferenciação de tumor primário de córtex adrenal e metástases de outras neoplasias, principalmente originárias em rim, fígado, outros adenocarcinomas e liposarcomas e o diagnóstico de feocromocitoma podem ser difíceis, sendo necessário um painel de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica para elucidar o problema.

A seguir, exemplificaremos os principais marcadores no diagnóstico diferencial destas neoplasias:

Tabela 1- Diagnóstico diferencial de carcinoma de córtex adrenal ADRENAL

Tumor	CK	VIM	NF	S100	EMA	CG	SYN	CEA	AFP
Carcinoma adrenal	-/+	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-
Feocromocitoma	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Carcinoma renal	+	+	-	+/-	+	-	-	-	-
Carcinoma hepatocelular	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	+
Adenocarcinoma metastático	+	+/-	-	+/-	+	-	-	+	-
Liposarcoma	-	+	-	+	-	-	-	-	-

(15)

Outro marcador de grande interesse na identificação de lesões de córtex adrenal são a inibina e o antígeno marcado pelo anticorpo monoclonal D11, apenas encontrado em células normais ou neoplásicas e em hepatócitos adrenocorticais.

Tumores da medula adrenal

As células da medula adrenal são consistentemente negativas para citoqueratinas, porém são positivas para cromograninas, NSE e neurofilamentos. Os anticorpos que reagem com neurofilamentos de 68-70 e 200KD identificam as células cromafínicas, assim como os feocromocitomas. A imunorreatividade para cromograninas é mais intensa em células da medula adrenal normal do que em neoplásicas.

As células sustentaculares, presentes na medula adrenal ao redor de ninhos de células cromafínicas, imunorreagem para proteína S-100, presentes em feocromocitomas, paragangliomas, hiperplasia medular de adrenal e em neuroblastomas. A ausência destas células positivas para S-100 nesses tipos de lesão tem sido considerado fator de pior prognóstico.

Além de catecolaminas e enzimas sintetizadoras de catecolaminas, que são demonstradas em células da medula adrenal normal e células neoplásicas, inúmeros outros peptídeos foram identificados: somatostatina, VIP, neuropeptídeo γ , leu-enkefalinas, meta-enkefalinas, ACTH e substância P.

Os marcadores imuno-histoquímicos para neuroblastomas foram discutidos no capítulo 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miettinen M, Franscilak Letho VP, Parasivuor R, Virtanen I. Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors. *Lab. Invest.* 1984; 50:262-270.
2. Fonseca E, Nesland JM, Hoie J, Sobrinho-Simões M. Pattern of expression of intermediate cytoke-
ratin filaments in thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial – type
cytoke-
ratin. *Virchows Arch.* 1997; 430(3):239-245.
3. Schelfhout LJD, Van Muijen GNP, Fleuren GJ. Expression of keratin 19 distinguishes papillary thyroid
carcinoma from follicular carcinoma and follicular thyroid adenoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989; 92:654-658.
4. Damiani S, Fratamico F, Lapertosa G, Dina R, Eusebi V. Alcian blue and epithelial membrane antigen are
useful markers in differentiating benign from malignant papillae in thyroid lesions. *Virchows Arch. (A)*
(*Pathol. Anat.*) 1991; 419:131-135.
5. Kargi A, Yörükoglu K, Akta SS, Cakalagaoglu Ermete M. Neuroendocrine differentiation in non-
neuroendocrine thyroid carcinoma. *Thyroid*, 1996; 6(3):207-210.
6. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, Mernyei M, Mori M, Oyama T, Machinami R. Overexpression of p53
as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993; 17(4):375-381.
7. Bjerneroth G, Juhlin C, Grimelius L, Rastad J, Akerstrom G. Improvement in Histological Diagnosis of
primary hyperparathyroidism with a monoclonal antiparathyroid antibody. *Endocr. Pathol.* 1992; 3:83-92.
8. Miettinen M, Clark R, Lehto B-P, Virtanen I, Damjanov I. Intermediate filament proteins in parathyroid
glands and parathyroid adenomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985; 109:986-989.
9. Vargas MP, Vargas HI, Kleiner DE, Merino MJ. The role of prognostic markers (MIB-1, RB, and bcl-2) in
the diagnosis of parathyroid tumors. *Mod. Pathol.* 1997; 10(1):12-7.
10. Arnold A. Molecular genetics of parathyroid gland neoplasia. *JCEM*, 1993; 77:1108-1111.
11. Cryns VL, Rubio MP, Thor A.D, Louis DN, Arnold A. P53 abnormalities in human parathyroid carcinoma.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1994; 78(6):1320-4.
12. Kayath MJ, Martin, LC, Vieira, JGH, Roman, LM, Nosé, V – “C-erb-2 immunoexpression in parathyroid
tumors and hyperplasias”. *End. Pathol.* 1999; 10(1):1-8.
13. Gaffey MM, Traweek ST, Mills SE et al. Cytokeratin expression in adrenal cortical neoplasia: Na
immunohistochemical and biochemical study with implications for the differential diagnosis of
adrenocortical, hepatocellular and renal cell carcinoma. *Hum. Pathol.* 1992; 23:144-153.
14. Miettinen M. Neuroendocrine differentiation in adrenal cortical carcinoma. New immunohistochemical
findings supported by electron microscopy. *Lab. Invest.* 1992;66:169-174.
15. De Lellis RA. The Adrenal Glands. Diagnostic Surgical Pathology. Second Edition. ed Stephen S.
sternberg. Raven Press, Ltd. New York, 1994.
16. Abbona GC, Papotti M, Gasparri G, Bussolati G. Proliferative activity in parathyroid tumors as detected by
ki-67 immunostaining. *Hum. Pathol.* 1995; 26(2):135-8.
17. Cote RJ, Cardon-Cardo C, Reuter VE, Rosen, PP. Immunopathology of adrenal and renal cortical tumors.
Coordinated change in antigen expression associated with neoplastic conversion in the adrenal cortex.
Am. J. Pathol. 1990; 136:1077-1084.
18. Eriksson B, Arnbergh H, Lindgren PG, Lorelius LE, Magnusson A et al. Neuroendocrine Pancreatic
tumors: clinical presentation, biochemical and histopathological findings in 84 patients. *J. Int. Med* 1990;
228:103-113.
19. Erlandsen S.L. Types of pancreatic islets cells and their immunohistochemical identification. In: *The*
Pancreas. International Academy of Pathology Monograph. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980; pg 140-
155.
20. Grimelius L, Johansson H. Pathology of parathyroid tumors. *Semin. Surg. Oncol.* 1997; 13:142-54.
21. Heitz PU. Pancreatic Endocrine Tumors. In: Kloppel G, Heitz, P.U., eds. *Pancreatic Pathology.* Edinburgh:
Churchill Livingstone, 1984; pg 206-232.

22. Heitz PU, Kasper M, Polak JM, Kloppel G. Pancreatic endocrine tumors; immunocytochemical analysis of 125 tumors. *Hum. Pathol.* 1982; 13:263-271.
23. Jasani B. Advances in immunocytochemistry of thyroid tumors. *Curr. Top. Pathol.* 1997; 91:21-36.
24. Karak A.K, Sarkar C, Chumber S, Tandon N. MIB-1 proliferative index in parathyroid adenoma & hiperplasia. *Indian. J. Med. Res.* 1997; 105:235-8.
25. Kayath MJ, Martin LNC, Vieira JGH, Alberti VN. A comparative study of p53 immunoexpression in parathyroid hyperplasias secondary to uremia, primary hyperplasia, adenomas and carcinomas. *Eur. J. Endocrinol.* 1998; 139:78-83.
26. Komminoth P et al. Polyasialic acid of the neural cell adhesion molecule in the human thyroid: An immunohistochemical study of 79 thyroid lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994; 18:399-441.
27. Li Volsi V.A. The utility of some modern techniques in Understanding Thyroid Pathology. *Endocr. Pathol.* 1990; 1:68-84.
28. Lloyd RV. Utility of Ki-67 as a prognostic marker in Pancreatic Endocrine Neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.* 1998; 109(3):245-247.
29. Loda M, Lipman J, Cukor B, Bur M, Kwan P, DeLellis RA. Nodular foci in parathyroid adenomas and hyperplasias: an immunohistochemical analysis of proliferative activity. *Hum. Pathol.* 1994; 25(10):1050-6.
30. Luts L, Bergenfelz A, Alumets J, Sundler F. Parathyroid function and histology in patients with parathyroid adenoma: correlation of clinical and morphologic findings. *World J. Surg.* 1997; 21(5):553-63.
31. Maluf HM, Koerner FC. Carcinoma of the breast with endocrine differentiation: a review. *Virchow Archiv.* 1994; 425:449-457.
32. Martin LNC, Kayath MJ, Vieira JGH, Alberti VN. Parathyroid glands in uremic patients with refractory hyperparathyroidism: p53 protein expression analysis. *Histopathology* 1998; 33(1):46-51.
33. Matsushita H, Usui M, Hara M, Shishiba Y, Nakazawa H, Honda K, Torigoe K, Kohno K, Kurimoto M. Co-secretion of parathyroid hormone and parathyroid-hormone-related protein via a regulated pathway in human parathyroid adenoma cells. *Am. J. Pathol.* 1997; 150(3):661-71.
34. Miettinen M, Lehto V-P, Virtanen I. Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors. *Am. J. Pathol.* 1985;118:360-366.
35. Mendelsohn G, Wells SA. Jr, Baylin SB. Relationship of tissue carcinoembryonic antigen and calcitonin to tumor virulence in medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1984; 54:657-662.
36. Miettinen M, Lehto V-P, Virtanen I. Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors. *Am. J. Pathol.* 1985;118:360-366.
37. Papotti M, Negro F, Carney JA, Bussolati G, Lloyd RV. Mixed medullary – follicular carcinoma of the thyroid. A morphological, immunohistochemical and in situ hybridization analysis of 11 cases. *Virchows Arch.* 1997; 430(5):397-405.
38. Perret AG, Mosnier JF, Buono JP, Berthelot P, Chipponi J, Balique JG, Cuilleret J, Dechelotte P, Boucheron S. The Relationship Between MIB-1 Proliferation Index and Outcome in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Anat. Pathol.* 1998; 109(3):286-293.
39. Sadler GP, Morgan JM, Jasani B, Douglas-Jones A, Wheeler MH. Epidermal growth factor receptor status in hyperparathyroidism: immunocytochemical and In situ hybridization study. *World J. Surg.* 1996; 20:736-42, discussion 742-3.
40. Subramaniam P, Wilkinson S, Shepherd J.J. P53 tumour suppressor gene expression in hyperparathyroidism. *Aust. N. Z. J. Surg.* 1996; 66(5):302-4.
41. Vassilopoulou-Sellin R, Ajani J. Islet cell tumors of the pancreas. *Endocrinol. Metabol. Clin. North. Am.* 1994; 23(1):53-65.
42. Yamaguchi S, Yachiku S, Morikawa M. Analysis of proliferative activity of the parathyroid glands using proliferating cell nuclear antigen in patientes with hyperparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(8):2681-8.

INTRODUÇÃO

A compreensão da genética e biologia molecular dos tumores cerebrais sofreu substancial progresso nos últimos 20 anos devido à colaboração de vários métodos diagnósticos e de pesquisa, incluindo microscopia eletrônica, histoquímica enzimática e imuno-histoquímica. Estes avanços diagnósticos permitiram melhoria na sobrevivência de pacientes com linfomas primários do sistema nervoso central (SNC) e oligodendrogliomas anaplásicos. Além disso, a imuno-histoquímica colaborou na identificação de novas entidades nosológicas no SNC, tais como o astrocitoma xantopleomórfico e o tumor disemбриoplásico neuroepitelial, neoplasias freqüentemente associadas à patogênese da epilepsia sintomática.

As principais aplicações da imuno-histoquímica em neuropatologia podem ser divididas em dois grandes grupos: a) a utilização da imuno-histoquímica para definição diagnóstica na qual, através da elaboração de painéis de anticorpos, iremos caracterizar uma neoplasia pouco diferenciada; e b) utilização da imuno-histoquímica para complementação diagnóstica, em que os anticorpos utilizados nos permitem avaliar parâmetros específicos de uma entidade nosológica, como os índices proliferativos dos astrocitomas, a intensidade de gliose nos espécimes provenientes de lobectomias temporais para tratamento das epilepsias refratárias e o estudo das doenças neurodegenerativas ⁽¹⁾.

Em recente levantamento identificamos em nossa unidade de imuno-histoquímica que 10,43% (n=196) dos casos estudados do período de 1987-97 (n=1878) corresponderiam a lesões provenientes do SNC. Neste grupo com aparente paridade entre os sexos (102 masculinos : 94 femininos) e faixa etária oscilando de 1 a 78 anos (média de 36 ± 19 anos), foram estudados casos de topografia variada (vide tabela 1), sendo que em somente 1,02% (n=2) a imuno-histoquímica sugeriu outro diagnóstico não previamente aventado através da avaliação dos cortes corados ao HE (vide tabela 2). Estes dados confirmam a necessidade de uma criteriosa avaliação anatomopatológica pelos métodos convencionais antes de elaborarmos a seleção dos anticorpos a serem pesquisados em lesões cerebrais ⁽¹⁾.

Topografia	Número de casos	%
Cérebro	156	79,59
Nervo Periférico	15	7,66
Medula Espinhal	10	5,10
Cerebelo	8	4,08
Meninges	4	2,04
Base de Crânio	3	1,53
Total	196	100

GRUPO	Número	%
IA – Definição diagnóstica	164	83,67
IB – Complementação diagnóstica	24	12,25
II – IMH não contribuiu para o diagnóstico	6	3,06
III – IMH permitiu outro diagnóstico não suspeitado previamente	2	1,02
TOTAL	196	100

MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Os avanços obtidos em neuro-oncologia através de imuno-histoquímica foram impulsionados pela identificação, em 1971, da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ^(2,3). Os principais anticorpos em neuropatologia funcionam em material incluído em parafina.

GFAP

Esta proteína corresponde a um filamento intermediário de subclasse III presente em astrócitos e muito utilizado no diagnóstico de astrocitomas e glioblastomas; possui peso molecular de 50Kda e forma filamentos gliais com cerca de 10nm em espessura ^(2,3).

A formação do GFAP ocorre através da fosforilação-defosforilação de sua proteína que contribui para a remodelação do arcabouço glial. Outro tipo de filamento intermediário de subclasse III, a **VIMENTINA**, co-localiza-se com o GFAP na glia imatura, reativa e radial, indicando que a vimentina também contribui na manutenção do arcabouço glial e

justificando a co-expressão destes filamentos em astrocitomas e glioblastomas. A imunorreatividade do GFAP no SNC maduro está concentrada em filamentos gliais de astrócitos, glia radial no cerebelo e astrócitos subependimários⁽³⁾.

A utilização do GFAP elucidou inúmeras controvérsias acerca da origem do clone celular de diversas neoplasias do sistema nervoso central, como glioblastoma, meduloblastoma, astrocitoma sub-ependimário de células gigantes, astrocitoma xantopleomórfico e ganglioglioma desmoplásico da infância; bem como constituiu em uma poderosa ferramenta da imuno-histoquímica diagnóstica, dada a sua expressão em astrocitomas, astrocitomas anaplásicos, oligodendrogliomas e papilomas de plexo coróide⁽²⁻⁵⁾.

PROTEÍNA S100

A proteína S100 é um dímero ligado ao cálcio com 20Kda, composto por duas unidades distintas, S100 alfa e S100 beta, resultando em 3 formas de expressão (alfa-alfa, alfa-beta, beta-beta). No que concerne às estruturas normais do SNC, a S100 é encontrada em astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias, alguns neurônios e células de Schwann, sendo a forma beta presente em 90% das amostras.

Apesar de considerada como específica às células neurais e derivadas da crista neural, atualmente identificou-se expressão deste marcador em vários tecidos humanos normais e neoplásicos, tais como condrossarcomas, lipomas, granulomas eosinofílicos, histiocitose X, adenoma pleomórfico, carcinoma medular da mama, carcinoma bronquíolo alveolar. A positividade da S100 é freqüente nos gliomas, glioblastomas, cordomas, papilomas de plexo coróide, meningiomas e melanomas, os quais reagem a ambas subunidades alfa e beta. Os adenomas hipofisários e os craniofaringiomas reagem apenas à subunidade alfa, enquanto os schwannomas, à subunidade beta. Deve-se salientar que os meduloblastomas e os linfomas primários do SNC não expressam este marcador^(2,6).

ENOLASE NEURÔNIO ESPECÍFICA (NSE)

Esta enzima citosólica é composta por duas das subunidades alfa-beta ou gama, podendo agrupar-se formando homo ou heterodímeros em 5 isoenzimas diferentes, classicamente utilizada para demonstrar, em conjunto com outros marcadores, a diferenciação neuronal ou neuroendócrina em neoplasias primárias do SNC, bem como marcar gliomas e carcinomas neuroendócrinos.

A enolase gama é positiva em neurônios, ao passo que a alfa é encontrada em células gliais, meningoteliais, endoteliais e células de Schwann. Altos níveis de NSE estão presentes nas adrenais, hipófise e sistema APUD. A subunidade gama perfaz cerca de 2% de toda proteína solúvel encontrada no encéfalo, entretanto pode ocorrer expressão desta subunidade na plaquetas, megacariócitos, células T e músculos liso e estriado⁽²⁾.

SINAPTOFISINA

A sinaptofisina é uma glicoproteína ligada ao cálcio com 38 Kda associada à membrana das vesículas pré-sinápticas. A expressão desta proteína durante a evolução

do SNC evidencia a sinaptogênese e a diferenciação nervosa terminal, sendo mais específico que a NSE ^(2,7).

A aplicação da sinaptofisina e de outras glicoproteínas de membrana da vesículas pré-sinápticas, como a **SV2** e a **SINAPTOBREVINA** tem sido de extrema valia como marcador na identificação das neoplasias neuronais e mistas glio-neuronais, tais como os gangliocitomas, gangliogliomas, neurocitomas centrais, tumor disemбриoplástico neuroepitelial e os tumores primitivos neuroectodérmicos (vide tabela 3) ^(7,8).

A sinaptofisina está presente em todos os tipos de neurônios, na medula adrenal e nas células do sistema neuroendócrino ⁽²⁾.

Tabela 3 - Aplicação da sinaptofisina, sinaptobrevina e SV2 nos diagnósticos diferenciais de neoplasias primárias do SNC. (adaptado da referência 8)

NEOPLASIA NEURONAL	MARCADORES	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
<p>GANGLIOGLIOMAS: neoplasias constituídas por células astrocitárias entremeadas por múltiplos neurônios grandes neoplásicos, os quais são diferenciados dos neurônios não neoplásicos pela arquitetura regional e pelos achados atípicos - binucleação, variações anormais de tamanho e distribuição não convencional.</p>	<p>SINAPTOFISINA*: positividade na superfície do pericário dos neurônios neoplásicos</p> <p>SV2**: reatividade similar à sinaptofisina.</p> <p>SINAPTOBREVINA***: reatividade similar à sinaptofisina</p>	<p>GLIOBLASTOMA S: segundo Miller, possivelmente os glioblastomas de bom prognóstico, sejam gangliogliomas.</p>
<p>NEUROCITOMAS CENTRAIS: anteriormente descritos como neoplasias intraventriculares raras, com escassos relatos de apresentações intraparenquimatosas</p>	<p>SINAPTOFISINA, SINAPTOBREVINA E SV2.</p>	<p>OLIGODENDROGLIOMAS: na concepção da patologia molecular, cerca de 50% dos oligodendrogliomas diagnosticados pela histologia, são neurocitomas centrais.</p>
<p>SINAPTOFISINA*: no córtex cerebral normal e nas outras regiões com substância cinzenta, apresenta imunorreatividade finamente granular no neurópilo.</p> <p>SV2** e SINAPTOBREVINA: proteínas de membranas de vesículas sinápticas.</p>		

NEUROFILAMENTOS

Neurofilamentos são filamentos intermediários encontrados apenas nos neurônios, os quais são compostos por 3 classes de cadeias polipeptídicas com pesos moleculares variando de 68 a 75 Kda (alto peso molecular), 140 a 175 Kda (médio peso molecular) e 180 a 212 Kda (baixo peso molecular), sendo que todas as classes são expressas nos axônios, pericários e dendritos de todos os neurônios. Como sua expressão limita-se ao tecido cerebral normal e às neoplasias neuronais, podem ser utilizados como marcadores pan-neuronais em tumores de origem incerta ^(2,9).

NESTINA

Esta proteína é um neurofilamento intermediário de classe VI com um peso molecular variando de 210 a 240 Kda, expressa por células progenitoras neuroepiteliais durante o desenvolvimento do SNC embrionário, sendo gradativamente eliminada com a sua maturação. Desta forma, a nestina representa um marcador para células precursoras no SNC, sendo demonstrada em uma grande variedade de tumores cerebrais como meduloblastomas, astrocitomas, glioblastomas, ependimomas, gangliogliomas e meningiomas. Positividade para nestina em tumores embrionários extra-axiais é freqüente ⁽²⁾.

PROTEÍNA TAU

A proteína tau é a principal proteína associada a microtúbulos do sistema nervoso central dos animais vertebrados, atuando como estabilizadora e organizadora da estrutura microtubular. Foi identificado um único gene que codifica os 6 subtipos desta proteína, os quais apresentam estrutura variando de 352 a 441 aminoácidos. Sua localização é predominantemente axonal no tecido cerebral normal.

Esta proteína consiste em um dos principais marcadores imuno-histoquímicos das doenças neurodegenerativas, sendo amplamente evidenciada em associação com novos neurofibrilares e corpúsculos de Pick ⁽¹⁰⁾.

Alz-50

Anticorpo monoclonal proveniente de homogenado de tecido cerebral de portadores de Doença de Alzheimer, o qual apresenta a propriedade de mapear os 10 aminoácidos ligados ao amino-terminal das proteínas tau recombinantes em seres humanos, tendo sua reatividade em tecido cerebral normal limitada a microtúbulos axonais ⁽²⁾.

Sua principal aplicação imuno-histoquímica consiste em evidenciar não somente as células associadas aos novos neurofibrilares, mas também aquelas que estão na iminência de iniciarem patologia neurofibrilar ^(2,10,11).

UBIQUITINA

Ubiquitina é um dos principais marcadores imuno-histoquímicos no estudo das doenças neurodegenerativas, dada as suas características de proteína de resposta ao estresse celular e marcadora de proteínas danificadas e anormais, bem como seu papel na morte celular programada ^(12,13).

Nos cérebros de jovens, não há estruturas reativas para esta proteína, contudo, observa-se positividade na mielina, nos processos nervosos, no *corpora amylacea* e nos corpúsculos densos relacionados aos lisossomos de cérebros de idosos normais.

Na avaliação das doenças neurodegenerativas, evidencia-se a associação da ubiquitina com inclusões de filamentos intermediários, bem como com outras estruturas relacionadas a cristalóide alfaB e enzimas da via da ubiquitina, como os corpúsculos de Lewy e as fibras de Rosenthal. Novelos neurofibrilares associados à proteína tau, inclusões em motoneurônios e neurônios não motores degenerados por esclerose lateral amiotrófica, bem como estruturas lisossomais alteradas por prionopatias também exibem reatividade para esta proteína ^(2,12,13).

IMUNO-HISTOQUÍMICA EM NEURO-ONCOLOGIA

1. Neoplasias astrocitárias

1.1. Astrocitomas

Os astrocitomas constituem um amplo grupo de entidades nosológicas da neuro-oncologia, diferindo entre si pela distribuição quanto à idade e ao sexo, crescimento, invasão de tecidos adjacentes, aspectos morfológicos, comportamento biológico e curso clínico ⁽¹⁴⁾. Há inúmeras evidências que estas neoplasias apenas refletem o tipo e a seqüência das alterações genéticas adquiridas durante o processo de oncogênese (Tabela 4).

Tabela 4 - Sumário dos principais achados imuno-histoquímicos e de biologia molecular das neoplasias astrocíticas (adaptado das referências 14,15)

Entidade	Alterações Imuno-histoquímicas	Biologia Molecular
Astrocitoma pilocítico	++ GFAP nos astrócitos pilocíticos + GFAP nos protoplasmáticos - GFAP nas fibras de Rosenthal	Incerta; possível alteração nos cromossomos 7 e 8
Astrocitoma difuso	Positividade variável para vimentina, proteína S100 e GFAP de acordo com subtipo histológico	Mutação de p53 (>65%) <i>Overexpression</i> PDGF-A e PDGFR-alfa (60%)
Astrocitoma anaplásico	+ variável para GFAP, sendo expressa pelas células com fenótipo astrogial ++ para vimentina e proteína S100	Acúmulo das alterações dos astrocitomas difusos associadas a: Perda da heterozigose de 19q Alteração do RB
Glioblastoma multiforme	+ variável para GFAP, sendo expressa nas células com fenótipo astrocitário + variável para vimentina + para ubiquitina	GB secundário: as alterações do astrocitoma anaplásico associadas a Perda da heterozigose de 10 / PTEN / MMAC Perda da expressão de DCC Amplificação de Nos GB primários: Alterações de EGFR, MDM2, RB Deleção de p16 Perda da heterozigose de 10 / PTEN / MMAC
Glioblastoma de células gigantes	Achados similares aos dos glioblastomas	Similar à biologia dos glioblastomas secundários
Gliossarcoma	+ para GFAP nas células com fenótipos astrocitários + para Antígeno do Fator VIII no componente sarcomatoso + para marcadores histiocíticos no componente sarcomatoso	Perda dos cromossomos 10 e 17 Ganho do cromossomo 7 Alterações nos cromossomos 3 e 9 Mutações do TP53
Astrocitomas xantopleomórfico	++ para GFAP nos astrócitos do componente xantomatoso ++ para sinaptofisina e NF nos astrócitos com lâmina basal própria	Mutações do tipo missense dos cólons 220, 273 e 292 do gene TP53 Amplificação do gene do EGFR Perda da heterozigose dos cromossomos 10q e 19q.
Astrocitoma Desmoplásico da Infância / Ganglioglioma Desmoplásico da Infância	++ GFAP e vimentina nas células gliais ++ ENE, vimentina, sinaptofisina no componente neuronal	Incerta, não havendo mutações do TP53.
Astrocitoma subependimário de células gigantes	++ GFAP, vimentina e NF no componente astrocitário	Alterações nos genes TSC 1 (cromossomo 9q) e TSC 2 (16p)

Como os astrocitomas difusos apresentam uma grande variabilidade histológica, o mesmo ocorre com a imuno-histoquímica. A tabela 5 demonstra os achados imuno-histoquímicos das três principais variantes.

Tabela 5 - Achados imuno-histoquímicos em astrocitomas difusos (adaptado da referência 15)		
Entidade	Marcador Imuno-histoquímico	Distribuição
Astrocitoma fibrilar	GFAP	Fortemente positivo na matriz fibrilar e difusamente nos astrócitos
	Vimentina	Região perinuclear dos astrócitos neoplásicos
	Proteína S100	Positividade em núcleos e processos celulares
Astrocitoma gemistocítico	GFAP	Fortemente positivo no pericário e processos celulares dos astrócitos gemistocíticos
	Vimentina	Região perinuclear dos astrócitos neoplásicos não gemistocíticos
	Proteína S100	Positividade em núcleos e processos celulares
Astrocitoma protoplasmático	GFAP	Positividade discreta nos astrócitos protoplasmáticos
	Vimentina	Região perinuclear dos astrócitos neoplásicos
	Proteína S100	Positividade em núcleos e processos celulares

A sobrevida média após a tumorectomia total varia de 6 a 8 anos. Além da extensão da retirada cirúrgica do tumor, a tendência à progressão maligna é um dos principais fatores prognósticos, a qual está vinculada à frequência da mutação do TP53. Quanto maiores as taxas de expressão de p53, menor é a sobrevida ^(15,16).

1.2. Astrocitoma anaplásico

Neoplasia astrocitária difusamente infiltrativa (OMS grau III) a qual apresenta anaplasia e alto potencial proliferativo, podendo evoluir a partir de um astrocitoma de

baixo grau, bem como surgirem de novo. Predominam no sexo masculino entre os 30 e 50 anos com sintomas similares aos dos astrocitomas difusos e sobrevida média de 36 meses após diagnóstico.

Os achados histológicos dos astrocitomas anaplásicos incluem alta celularidade, pleomorfismo nuclear, mitoses e proliferação vascular. A imunorreatividade para GFAP é intensa porém não encontrada em todas as células tumorais; proteína S100 e vimentina são marcadores com alta positividade.

Os astrocitomas anaplásicos pode exibir um grande número de alterações genéticas, as quais são sumarizadas na tabela 6 ^(15,17, 18).

Tabela 6 - Alterações genéticas em Astrocitomas Anaplásicos (adaptado das referências 15, 17,18)	
Alteração	Freqüência
Mutação de p53	65%
<i>Overexpression</i> de PDGF-A e PDGFR-	60%
Perda da heterozigose de 19q	50%
Alteração do gene do retinoblastoma (RB)	25%

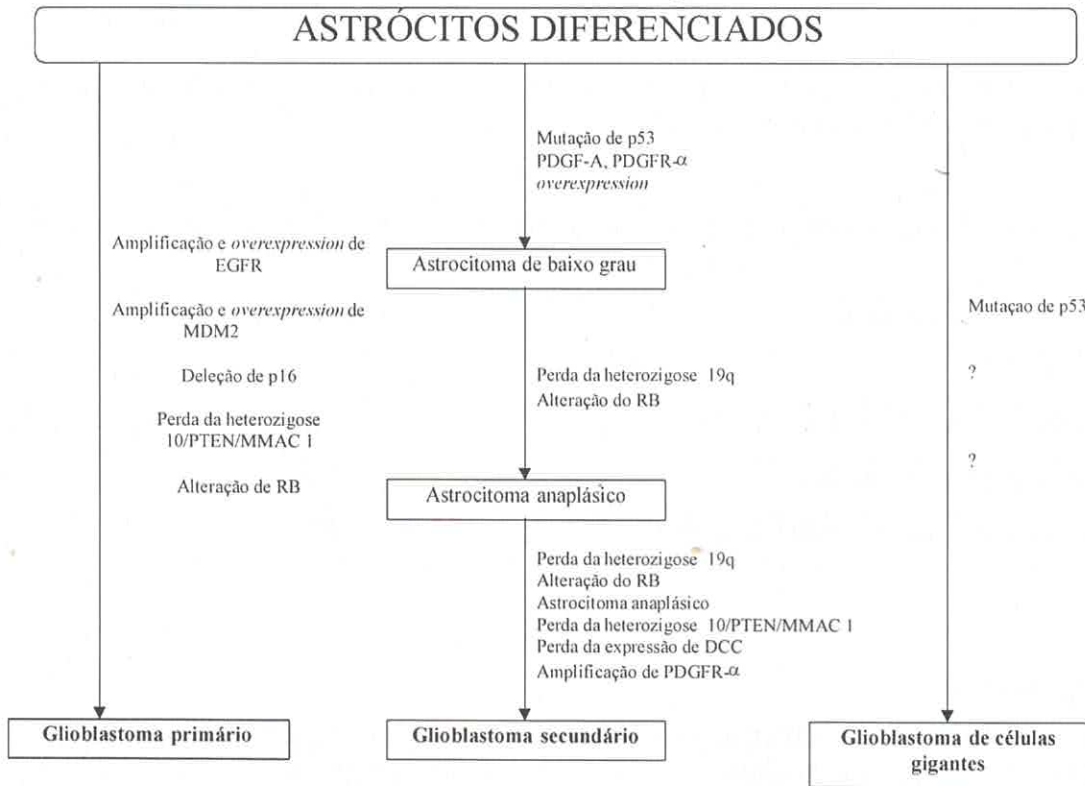
1.3. Glioblastoma

O glioblastoma é o tumor astrocitário mais comum e maligno predominando nos hemisférios cerebrais de adultos, sendo originário da progressão maligna de um astrocitoma de baixo grau ou astrocitoma anaplásico (glioblastoma secundário), ou podendo apresentar-se com curta história clínica, sem evidência clinico-radiológica de lesão precursora menos maligna (glioblastoma primário). Correspondem a cerca de 12-15% de todas neoplasias intracranianas e a 50-60% de todos os tumores astrocitários. Acometem todas as faixas etárias com história clínica curta e sintomas neurológicos inespecíficos como cefaléia, alteração de conduta porém sempre com evolução abrupta para síndrome de hipertensão endocraniana.

O grau de positividade para GFAP é extremamente variável nos diversos componentes celulares dos glioblastomas. Geralmente, as células similares a astrócitos, principalmente aquelas com aspecto gemistocítico, são fortemente positivas para este marcador, ao passo que as células pequenas e indiferenciadas são negativas ou discretamente reativas. As células gigantes multinucleadas expressam uma reatividade variável para GFAP. Uma peculiaridade das células de aspecto gemistocítico é a positividade para GFAP apenas na periferia celular. A positividade para vimentina é comum. Imunorreatividade para ubiquitina, apesar de estar presente, é menos significativa ⁽¹⁵⁾. As principais alterações genéticas e suas influências na gênese do glioblastoma estão enfatizadas no quadro 1.

Quadro 1 - Aspectos genéticos da evolução dos glioblastomas primários e secundários (Modificado de Kleihues, e Ohgaki, 1997) (17)

O prognóstico dos glioblastomas é reservado, porém a ressecção completa da lesão confere uma maior sobrevida; além disto os glioblastomas secundários comportam-



se menos agressivamente que os primários (17,18). Os índices proliferativos não apresentam correlação com a sobrevida, o que também é observado nos diferentes tipos histológicos (15,19).

1.4. Glioblastoma de células gigantes

Variante histológica do glioblastoma clássico com predominância de células gigantes bizarras multinucleadas e, ocasionalmente, presença de um estroma abundante em reticulina. Corresponde a cerca de 5-6% de todos os glioblastomas, predominando em adultos do sexo masculino. A expressão de GFAP por esta variante de glioblastoma é extremamente variável. Apresentam freqüentes mutações de TP53 e ausência de *overexpression* de EGFR, de amplificação de CDK4 e de deleção de p16 (17). O prognóstico desta variante é um pouco melhor que dos portadores do glioblastoma clássico, possivelmente porque o comportamento biológico das células gigantes seja menos infiltrativo (15).

1.5. Gliossarcoma

Variante do glioblastoma clássico com evidente componente sarcomatoso, representando cerca de 2% de todos os glioblastomas. Envolve hemisférios cerebrais de adultos com freqüentes crises convulsivas ⁽²⁰⁾.

A análise macroscópica evidencia massa superficial e firme por vezes simulando meningioma. Apresenta histologia bifásica com áreas de glioblastoma e áreas mesenquimais. O componente sarcomatoso exibe características de fibrossarcomas ou fibrohistiocitomas malignos. Podem, ainda, apresentar formação de cartilagem, osso, tecido ósteo-condral, músculo estriado e liso. Epitélio queratinizado estratificado, bem como formações adenóides podem ser observadas, evidenciando metaplasia epitelial ^(15,20).

Como a proliferação vascular é o achado característico dos gliossarcomas, por vários anos aceitou-se que o componente sarcomatoso derivaria desta proliferação, o que é corroborado por achados alguns achados imuno-histoquímicos. Contudo, a teoria atualmente aceita propõe que o tal componente resulte de uma progressão maligna da porção glial, com uma perda da reatividade imuno-histoquímica para GFAP; tal hipótese é sustentada pelo achado de trissomia do cromossomo X e alterações idênticas dos cromossomos 10 e 17, bem como mutações igualmente idênticas do TP53 em ambos os componentes de um mesmo espécime neoplásico ^(21,22). Desta forma há positividade para GFAP no componente com diferenciação gliomatosa e o componente sarcomatoso pode exibir positividade para antígeno relacionado ao fator VIII, vimentina e marcadores histiocíticos ^(15,21,22).

1.6. Astrocitoma de células gigantes

O astrocitoma de células gigantes é uma variante rara das neoplasias gliais, freqüentemente associado à esclerose tuberosa, podendo haver formas esporádicas. Possui caráter familiar, estando ligado a um gene autossômico dominante localizado no braço longo do cromossomo 9. Esta neoplasia, de crescimento lento e aspecto celular benigno, afeta ambos os sexos de maneira similar com freqüência na primeira e segunda décadas de vida; local preferencial é a parede dos ventrículos laterais, podendo obstruir o forame de Monro e causar hidrocefalia, principal sintoma da doença. O astrocitoma de células gigantes correspondem a cerca de 1,5% dos tumores astrocitários na cidade de Curitiba, em análise dos prontuários dos principais centros hospitalares nos últimos 5 anos ⁽²³⁾.

O estudo imuno-histoquímico do astrocitoma de células gigantes sugere que suas células são pluripotenciais, expressando características neuronais e gliais, com células tumorais positivas para GFAP e vimentina, indicativo da presença de componente astrocítico. A resposta à enolase e neurofilamento é moderadamente positiva, sugerindo a presença de diferenciação neuronal na neoplasia ^(15,23).

1.7. Astrocitoma xantopleomórfico

O astrocitoma xantopleomórfico é um tumor de prognóstico favorável, encontrado principalmente no lobo temporal de crianças e adultos jovens e relacionado à epilepsia. São aderidos à dura máter, freqüentemente acompanhados por um cisto com nódulo

intramural. Tem aspecto variegado ao exame histopatológico onde se observa elementos fusiformes associados a células gigantes mono ou multinucleadas cujos núcleos são variáveis em tamanho. A atividade mitótica é inconspícua, bem como necrose está ausente ⁽⁵⁾.

A imuno-histoquímica demonstra positividade para GFAP com acentuação na periferia do corpo celular. Pode, ainda, ocorrer positividade ocasional para sinaptofisina e neurofilamentos ^(5,15,24). Apesar de seu aspecto pleomórfico, o comportamento biológico desta neoplasia é mais brando. Entretanto, em alguns casos podem evoluir para astrocitomas xantopleomórficos ou glioblastomas.

2. Tumores oligodendrogliais e gliomas mistos

2.1. Oligodendrogliomas

Os oligodendrogliomas são entidades clinico-patológicas bem definidas, contudo a escassez de marcadores imuno-histoquímicos tem dificultado sua caracterização imunofenotípica ⁽⁸⁾. As alterações genéticas destas neoplasias diferem daquelas encontradas nos astrocitomas. Têm crescimento difuso, infiltrativo e lento com curso indolente e bom prognóstico. Correspondem a cerca de 4 a 5% de todos os tumores cerebrais primários e cerca de 5 a 18% de todas as neoplasias gliais intracranianas. Predominam em adultos, mulheres, e o lobo frontal está acometido em cerca de 50 a 65% dos pacientes ⁽²⁵⁾.

Ainda não foi encontrado um marcador biológico específico para células oligodendrogliais neoplásicas. Pode haver positividade para proteína S-100, Leu-7 e vimentina. Proteína glial fibrilar ácida pode ser positiva em oligodendróctios minigemistocísticos ou gliofibrilares, o que é corroborado por estudos ultraestruturais. Resultados conflitantes foram encontrados com galactocerebrosideo (GalC), supostamente específico de fenótipo oligodendrogliar, glicoproteína associada a mielina (MAG), proteína básica de mielina (MBP) e proteína proteolípide (PLP). A utilização de marcadores de proliferação celular, como Ki67 (MIB-1), evidenciou-se significativamente positiva em oligodendróctios gliofibrilares, mas pouco freqüente no restante das células neoplásicas, o que enfatiza o crescimento lento do tumor ^(15, 26, 27).

2.2. Oligodendroglioma anaplásico

Oligodendroglioma que exhibe sinais focais ou difusos de anaplasia, representada por um aumento da celularidade, atipia nuclear, pleomorfismo celular e alta atividade mitótica. Proliferação vascular neoplásica e áreas de necrose, por vezes em arranjo pseudo-paliçado, podem ser evidenciadas. Nestes casos, a diferenciação com glioblastomas é mandatória, sendo feita através da observação da trama vascular ramificada e da presença de microcalcificações ^(14,15). Como nos oligodendrogliomas OMS grau II, podemos observar reatividade para proteína S-100, Leu-7, vimentina, bem como GFAP pode ser positiva em oligodendróctios anaplásicos ^(26,27). Exhibem deleções do cromossomo 9p e 10, o que reflete a aquisição de alterações malignas em relação aos oligodendrogliomas. Cerca de 10% destas neoplasias podem exhibir amplificações de proto-oncogenes como a co-amplificação de EGFR e RB; de CDK4 e SAS; EGFR e MYCN; e GLI e MYCN ⁽¹⁵⁾.

Estima-se que a sobrevida para os oligodendrogliomas anaplásicos seja de 41% para 5 anos livre da doença e de 20% para 10 anos, com uma sobrevida média de 3,9 anos. A maioria dos pacientes vai a óbito por recorrência local, contudo o achado de metástases através do líquido céfalo-raquidiano, bem como metástases à distância não é raro ^(15,25).

3. Ependimomas

Originam-se da camada ependimária que recobre os ventrículos cerebrais e o canal central da medula espinhal, predominando em crianças e adultos jovens. Correspondem a cerca de 3-9% de todos os tumores neuroepiteliais, sendo os gliomas mais freqüentes na medula espinhal e em até 25% dos casos podem apresentar anaplasia.

Os ependimomas são focalmente reativos para GFAP, havendo reação proeminente nas pseudorosetas. Tipicamente, são positivos para proteína S100. O antígeno de membrana epitelial (EMA) pode ser positivo na superfície luminal das rosetas ependimárias.

Há uma possível associação da transformação neoplásica das células ependimárias com infecção pelo vírus SV40, o que foi demonstrado pela identificação de fragmentos de DNA viral nas células neoplásicas, bem como pela detecção imunohistoquímica do antígeno T grande ⁽¹⁵⁾.

As crianças apresentam prognóstico pior quando comparadas aos adultos, sendo especialmente reservado nos casos abaixo de 1 ano de idade. As lesões supra e infratentoriais apresentam um curso clínico pior quando comparadas às lesões de medula espinhal e cauda eqüina. Com relação à gradação histológica, a sobrevida livre de doença se mostrou menor nos casos de ependimoma anaplásico os quais tem tendência de disseminação pelo líquido ⁽¹⁵⁾.

3.1. Ependimoma mixopapilar

Variante do ependimoma clássico que predomina na cauda eqüina e no *filum terminale*, sendo caracterizado células neoplásicas cubóides positivas para GFAP e vimentina, dispostas radialmente em torno dos vasos sanguíneos, exibindo extensa degeneração hialina e mucinosa. Acometem pacientes masculinos e jovens, correspondendo a cerca de 13% de todos os ependimomas e a 83% dos ependimomas quando considerada apenas a localização em *filum terminale*.

Esta neoplasia exibe bom prognóstico (grau I OMS) ⁽¹⁴⁾ com uma média de 14 anos livre de doença após ressecção total ou parcial seguida de radioterapia. Recorrência tardia ou metástases à distância são incomuns ⁽¹⁵⁾.

3.2. Subependimoma

São neoplasias histologicamente classificadas como OMS grau I ⁽¹⁴⁾, caracterizadas por ninhos de células neoplásicas imersas numa densa matriz fibrilar, geralmente de localização intra ou sub-ventricular. São geralmente assintomáticos e consistem em achado ocasional de autópsia representando cerca de 8,3% de todos os

ependimomas. Em cerca de 50 a 60% dos casos localizam-se no IV ventrículo e em 30 a 40% dos casos, nos ventrículos laterais ⁽¹⁵⁾.

Os tumores são nódulos esbranquiçados e firmes, com diâmetros variando de 1 a 2cm. Por vezes, as lesões de IV ventrículo são volumosas comprimindo o mesencéfalo; podem ainda sofrer cistificação, calcificação e hemorragia. Ocasionalmente os processos gliais GFAP positivos dispõem-se ao redor dos vasos formando pseudo-rosetas ependimárias ⁽¹⁵⁾.

4. Neoplasias do plexo coróide

As neoplasias do plexo coróide predominam em crianças, sendo as neoplasias do SNC mais frequentes no primeiro ano de vida. Recentes relatos associaram a participação do vírus SV40, bem como de outros vírus de DNA, na etiopatogenia destas neoplasias. Acometem ventrículos laterais (50%), III ventrículo (5%) e IV ventrículo (40%). Há escassos relatos de localizações ectópicas, tais como, ângulo ponto-cerebelar, intra-parenquimatoso e supra-selar. Manifestam-se com hidrocefalia, aumento da pressão endocraniana, vômitos, estrabismo e cefaléia. Duas entidades compõem este grupo:

- **Papiloma do plexo coróide (OMS grau I):** lesão benigna, de crescimento lento.
- **Carcinoma do plexo coróide (OMS grau III):** variante maligna.

O diagnóstico diferencial entre os tumores de plexo coróide e os carcinomas metastáticos para SNC pode ser extremamente difícil, sendo que a imuno-histoquímica tem-se mostrado de extrema valia para elucidar os casos em que a histopatologia é inconclusiva (tabela 7).

Tabela 7 - Perfil imuno-histoquímico comparativo entre os neoplasias do plexo coróide e carcinomas metastáticos (adaptado das referências 15,28)

Neoplasia	EMA	CK	S100	GFAP	CEA	HEA125	BerEP4
Papiloma do plexo coróide	++	++	++	+ (25-55%)	+/-	- (90%)	- (90%)
Carcinoma do plexo coróide	+	++	-	+ (20%)	+/-	-(90%)	-(90%)
Carcinomas metastáticos	+	++	+/-	-	++	+ (95%)	+ (95%)

CK = citoqueratinas; EMA = antígeno de membrana epitelial; S100 = proteína S100; CEA = antígeno carcinoembrionário.

5. Neoplasias do parênquima pineal

Neoplasias derivadas dos pineócitos ou aos seus precursores embrionários podem originar um amplo espectro de tumores, variando daqueles compostos por elementos maduros (pineocitoma) àqueles nos quais o componente primitivo e imaturo é predominante (pineoblastomas).

Os tumores de pineal expressam positividade para sinaptofisina, SV2, NSE, neurofilamentos, cromogranina A, antígeno retinal S. A diferenciação astrocitária é

comprovada pela positividade para proteína S100 e GFAP; ao passo que a imunorreatividade para antígeno retinal S e rodopsina marcam a diferenciação fotorreceptora ^(14, 15, 29).

6. Neoplasias neuronais e mistas neuronais-gliais

6.1. Gangliogliomas

Gangliogliomas são neoplasias incomuns, de crescimento lento e expansivo que comprometem preferencialmente o lobo temporal de crianças e adultos jovens (1,2 a 4% dos tumores do SNC), não havendo prevalência quanto ao sexo. A associação com malformações cerebrais foi encontrada em 5 a 24% dos casos ⁽¹⁵⁾.

Reatividade para GFAP no componente glial, bem como positividade para NSE, sinaptofisina, SV2, sinaptobrevina e neurofilamentos pode ser evidenciada no pericário e processos neuronais ^(8,15).

6.2. GANGLIOGLIOMAS DESMOPLÁSICOS DA INFÂNCIA

O comportamento biológico desta lesão é favorável, apesar das grandes dimensões e, nos casos de ressecção cirúrgica adequada, longa sobrevida é relatada.

A análise imuno-histoquímica dos GDIs evidencia uma positividade para sinaptofisina, e enolase enquanto as áreas gliais são positivas para GFAP e vimentina ^(30,31).

6.3. Tumor disembrionoplástico neuroepitelial

O tumor disembrionoplástico neuroepitelial é uma entidade tumoral recentemente descrita. Imuno-histoquímica é indispensável para caracterização dos neurônios (NSE, sinaptofisina) permitindo diferencial com astrocitoma microcístico e oligodendroglioma ⁽¹⁵⁾.

7. Tumores embrionários

Os meduloblastomas (OMS grau IV) são neoplasias cerebelares malignas e invasivas, predominando em crianças, com disseminação através do líquido céfalo-raquidiano. Originam-se de célula indiferenciada pluripotencial, situada na camada granular externa, podendo apresentar diferenciação neuronal, glial e ependimária.

Cerca de 75% dos meduloblastomas na infância originam-se do verme cerebelar; os situados nos hemisférios acometem pacientes de idade mais avançada ^(14,15). Os principais achados imuno-histoquímicos estão na tabela 8.

Tabela 8 - Expressão de marcadores imuno-histoquímicos nos meduloblastomas (adaptado da referência 15)	
Marcador	Reatividade
Sinaptofisina	Fortemente positiva nas rosetas neuroblásticas e nódulos tumorais
Nestina	Positividade celular difusa
Vimentina	Fortemente positiva nas células neoplásicas
GFAP	Positividade nas células neoplásicas com diferenciação astrocitária
Neurofilamentos	Reativos nas células com diferenciação neural
Antígeno retinal S	Positividade focal
N-CAMs	Positividade difusa

8. Neoplasias das meninges

Uma grande variedade de lesões neoplásicas podem se desenvolver nas meninges, contudo a lesão mais prevalente é a derivada das células meningoteliais, ou seja, os meningiomas, que correspondem a 16,9% das neoplasias primárias do SNC e ocorrem principalmente em pacientes com 40 a 60 anos, predominando no sexo feminino. A sintomatologia está relacionada com a localização do tumor e a compressão extrínseca das regiões cerebrais adjacentes pela massa tumoral de crescimento lento e expansivo (32).

Meningiomas apresentam positividade para inúmeros anticorpos incluindo vimentina, proteínas derivadas de desmossomas (desmoplaquinas I e II), antígeno de membrana epitelial (EMA) e proteína S-100. Os graus de positividade variam conforme a técnica imuno-histoquímica utilizada. Receptores de progesterona foram também detectados em meningiomas em até 72% dos casos parecendo, entretanto, que sua síntese não depende da síntese estrogênica prévia como em outros tecidos, tais como mama e endométrio. Finalmente, o advento recente da avaliação de índices proliferativos nucleares por citometria de imagem e fluxo com bromodeoxiuridina (BRDU) e anticorpos monoclonais tipo Ki-67 e PCNA acrescem novos parâmetros para a definição do comportamento biológico dos meningiomas, com os tumores mais predispostos a recidiva apresentando índices proliferativos estatisticamente mais elevados que os não recorrentes (15,32).

9. Hemangiopericitomas das meninges

Os hemangiopericitomas representam de 1,3 a 4% dos tumores de meninge e menos de 1% de todos os tumores do SNC. Os sinais e sintomas clínicos refletem a localização do tumor no SNC e por mais que seja um tumor vascular, raramente se apresenta com hemorragia intracraniana. Acometem mais homens na 4ª e 5ª décadas (33).

Estudos imuno-histoquímicos confirmam a origem mesenquimal do hemangiopericitoma, demonstrando a sua positividade para a vimentina e a negatividade para o EMA, CK, proteína S100, GFAP e actina. Incomum é a positividade para a desmina encontrada em 30% de nossos casos (n=10) porém os pericitos normais têm uma íntima relação com as células musculares lisas das paredes vasculares por vezes expressando este marcador ⁽³³⁾.

10. Linfomas primários do sistema nervoso central

Linfomas primários do SNC (LPSNC) são neoplasias linfoproliferativas extranodais consideradas raras até há pouco tempo, representando 0,3-1,5% de todas as neoplasias intracranianas, 1,7-2% de todos os linfomas Não-Hodgkin e 1,6% dos linfomas malignos extranodais. Atualmente existe aumento de incidência em pacientes com imunodeficiências congênitas (síndromes de Wiskott-Aldrich e da deficiência de imunoglobulina A), nas imunodeficiências idiopáticas (lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide) e nas imunodeficiências adquiridas como na SIDA. Se a incidência dos LPSNC continuar crescendo de acordo com a atual trajetória, representarão o tipo mais comum de neoplasia maligna primária do SNC no ano 2000 ⁽⁶⁾.

A maioria dos LPSNC são de células grandes. Quanto ao fenótipo os marcadores imuno-histoquímicos demonstram que os LPSNC são predominantemente de linhagem B sendo que apenas 1,5-3,5% destas neoplasias apresentam linhagem linfocitária T ⁽⁶⁾.

Especula-se a associação do vírus de Epstein-Barr (EBV) à patogênese dos LPSNC. O EBV pode ser detectado por hibridização *in situ* nas células neoplásicas, principalmente em indivíduos HIV-positivos e, em menor frequência, em indivíduos HIV-negativos. Pacientes com LPSNC têm pior prognóstico do que os pacientes com doença sistêmica, com sobrevida variando de 11 a 36 meses.

11. Neoplasias dos nervos periféricos

Os schwannomas (OMS grau I) são tumores benignos e de crescimento lento provenientes das células de Schwann das bainhas dos nervos periféricos e cranianos, correspondendo a cerca de 8% dos tumores intracranianos e 29% das neoplasias da medula espinhal. Acometem mais o sexo feminino entre a quarta e sexta décadas de vida.

O perfil imuno-histoquímico evidencia reatividade extensa para proteína S100, bem como positividade focal para GFAP e LEU-7, sendo de extrema valia no diagnóstico diferencial com sarcomas fusocelulares e fibromatoses ^(14,15).

A análise citogenética dos schwannomas demonstrou alterações do gene NF2, sendo que mutações que inativam este gene foram evidenciadas em cerca de 60% dos schwannomas esporádicos. Perda da expressão da proteína merlin parece ser um achado universal destas neoplasias ⁽¹⁵⁾.

IMUNO-HISTOQUÍMICA EM DOENÇAS DEGENERATIVAS

1. Doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa caracterizada por déficits da memória recente, alterações da personalidade e da afetividade, de início insidioso e curso devastador, sendo a principal causa de demência na América do Norte na população de 55 a 70 anos, correspondendo a cerca de 70% de todos os casos.

Imuno-histoquímica usando anticorpos para peptídeo A4 pode ser de extrema valia na análise anatomopatológica dos casos de DA, principalmente nos espécimes obtidos através de biópsias estereotáxicas. Anticorpos monoclonais para proteína A4 ainda podem revelar deposição amilóide nas paredes dos vasos afetados pela angiopatia cerebral amilóide, além de reatividade para placas senis e deposição de amilóide no neurópilo distrófico, o que é corroborado pela reatividade ao anticorpos anti-Tau ^(2, 10, 11).

Os novelos neurofibrilares são compostos por uma proteína Tau associada aos microtúbulos, a qual pode ser evidenciada pela reatividade a anticorpos anti-Tau, bem como por positividade à ubiquitina ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

Corpúsculos de Hirano são corpúsculos intracitoplasmáticos cristalinos pequenos e eosinofílicos, ocasionalmente encontrados nos cérebros normais e numa grande variedade de doenças neurodegenerativas, sendo mais característico da doença de Alzheimer. Estes corpúsculos apresentam forte positividade à análise imuno-histoquímica para actina ^(2, 10-12).

Corpúsculos de Lewy são inclusões intraneuronais arredondadas e eosinofílicas, com um centro hialino e um halo periférico pálido, os quais são encontrados em inúmeras alterações degenerativas do sistema nervoso central, entre estas, o mal de Parkinson, atrofia multi-sistêmica, paralisia supranuclear progressiva, degeneração córtico-basal, doença dos motoneurônios, distrofia neuroaxonal, síndrome de Down e a doença de Alzheimer, dentre outras. A análise imuno-histoquímica destes corpúsculos revela forte positividade para ubiquitina e neurofilamentos ⁽¹¹⁻¹³⁾.

2. Doença de Pick (DP)

A doença de Pick é uma forma de demência rara, de curso lento e inexorável, na qual a atrofia cerebral é predominantemente localizada, situando-se no neocórtex dos lobos frontais e temporais, sendo os giros pré-central e temporal pósterosuperior os mais acometidos.

A análise imuno-histoquímica evidencia positividade para GFAP nas regiões onde a gliose é intensa, bem como os corpúsculos de Pick são reativos para ubiquitina, proteína Tau e Alz-50 (tabela 9).

3. Esclerose lateral amiotrófica (ELA)

A esclerose lateral amiotrófica representa a forma mais freqüente de doença neurodegenerativa dos neurônios motores, podendo estar associada em 5 a 10% dos casos com uma transmissão hereditária autossômica dominante. Caracteriza-se por um acometimento de duas classes de motoneurônios, a saber: 1) neurônios motores

inferiores, localizados nos cornos anteriores da medula espinhal e 2) neurônios motores superiores, os quais apresentam seus pericários situados na camada 5 do córtex motor.

O perfil imuno-histoquímico evidencia intensa reatividade para neurofilamentos nos esferóides axonais, corroborando com sua composição rica em neurofilamentos. Contudo, o achado característico da ELA consiste na positividade para ubiquitina nos corpos celulares dos neurônios motores situados no corno anterior da medula, em inclusões situadas nos motoneurônios corticais e nas células do córtex não motor, o que não é observado nas outras formas de doença dos neurônios motores ⁽²⁾.

4. Doença de Parkinson (DPA)

A DPA, descrita por James Parkinson em 1917, é uma doença dos gânglios da base, caracterizada por um decréscimo das projeções dopaminérgicas provenientes da substância negra, cuja sintomatologia é representada por tremores rítmicos ao repouso (tremores “em contar dinheiro”), aumento do tônus muscular, rigidez, acinesia e bradicinesia.

As alterações neuropatológicas observadas nesta doença são representadas por uma degeneração da substância negra e do *locus coeruleus*, na qual se evidencia uma perda neuronal associada a gliose reativa, bem como corpúsculos de Lewy. Estes corpúsculos apresentam forte reatividade imuno-histoquímica para ubiquitina e neurofilamentos, sendo diferenciados dos corpúsculos de Lewy de outras doenças neurodegenerativas pela ausência de reação à proteína Tau e à Alz-50 (tabela 9) ^(2, 10-13). Outras alterações encontradas compreendem a destruição das vias nigroestriatais e a degeneração do estriado, sendo mais atingido o putâmen.

5. Doenças neurodegenerativas ocasionadas por prions

As doenças de Creutzfeld-Jakob (DCJ), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), Kuru e Insônia Familiar Fatal (IFF) são doenças neurodegenerativas causadas por prions e freqüentemente transmissíveis a animais de laboratório. A principal hipótese etiológica para estas doenças sugere que sejam ocasionadas por uma partícula proteínica infecciosa (*prion*) destituída de qualquer tipo de ácido nucléico, a qual é supostamente codificada por um gene do hospedeiro situado no braço curto do cromossomo 20. A isoforma normalmente expressa por esse gene, a proteína PrP^C, é uma proteína transmembrana, a qual se acumula durante o desenvolvimento nas células do sistema nervoso central, sendo sua função desconhecida. Nos casos de prionopatias, há um acúmulo de uma forma modificada desta proteína, a PrP^{Sc}, a qual apresenta as propriedades de ser resistente à ação das proteases, bem como de se agregar em partículas fibrilares.

A imuno-histoquímica para as variantes da proteína PrP^C tem se mostrado de extrema valia na diferenciação entre essas entidades, bem como no diagnóstico diferencial com alterações espongiiformes artefactuais.

Tabela 9 - Achados imuno-histoquímicos nas doenças neurodegenerativas (adaptado das referências 2,, 10-13)

	Ubiquitina	NF	Tau	GFAP	Actina	Alz-50	Beta-A4	alfaB cristalóide
Novelos neurofibrilares	+	+	+	-	-	+	+****	-
Placas neuríticas	-	-	-	-	-	+***	+	-
Angiopatia amilóide	-	-	-	-	-	-	+	-
Corpúsculos de Hirano	-	-	-	-	+	-	-	-
Corpúsculos de Lewy	+	+	+/-*	-	-	+/-*	-	-
Corpúsculos de Pick	+	-	+	-	-	+	-	-
Fibras de Rosenthal	+	-	-	+**	-	-	-	+
Esferóides Axonais	+	+	-	-	-	-	-	-

+/-*: ausência de reatividade para proteína Tau e para Alz-50 nos corpúsculos de Lewy encontrados na Doença de Parkinson, contudo em outras doenças neurodegenerativas, sua positividade pode ocorrer.

+**.:positivo na periferia da fibra.

+***: a positividade para Alz-50 nas placas neuríticas apresenta padrão similar à reatividade nos novos neurofibrilares.

+****: positividade predominantemente extracelular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bleggi-Torres LF, Noronha L, Telles JEQ. A importância da Imuno-histoquímica no diagnóstico anatomopatológico em Hospital Geral: análise de 885 casos. *Jornal Brasileiro de Patologia* 1995; 31(2), 65-71.
2. Hinton DR. Diagnostic immunohistochemistry of the nervous system. In: TAYLOR, C.R. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*, 2nd ed., W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1994.
3. Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* 1994; 4: 239-244.
4. Kleihues P, Ohgaki H, Aguzzi A. Gliomas. In: Kettenmann, H.; Ransom, B.R., (eds), *Neuroglia*. Chapter 69, pp. 1044 – 1063, Oxford University Press: Oxford, 1995.
5. Paulus W, Peiffer J. Does the pleomorphic xanthoastrocytoma exist? Problems in the application of immunological techniques to the classification of brain tumors. *Acta Neuropathol. Berl.* 1988; 76: 245-52.
6. Bleggi-Torres LF, Jacob GV, Medeiros BC, Pedrosa A. Linfomas primários do sistema nervoso central. *Patologia (México)* 1996, 35, 59-63.
7. Thiel G. Synapsin I, Synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol.* 1993; 3: 87-95.
8. Miller DC. New perspectives on neuronal neoplasms. *Brain Pathol.* 1997; 7: 1139-1140.
9. Nixon RA. The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol.* 1993; 3: 29-38.
10. Kosik KS. The molecular and cellular biology of tau. *Brain Pathol.* 1993; 3: 39-43.
11. Trojanowski JQ, Schmidt ML, Schin RW, Bramblett GT, Rao D, Lee VMY. Altered tau and neurofilament proteins in neuro-degenerative diseases: diagnostic implications for Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain Pathol.* 1993; 3: 45-54.
12. Lowe J, Mayer RJ, Landon M. Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.* 1993; 3: 55-65.
13. Ciechanover A. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway. *Brain Pathol.* 1993; 3: 67-75.
14. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 1993; 3: 255-268.
15. Kleihues P, Cavenee WK. *Tumors of the nervous system – Pathology & Genetics*. IARC, 1997.
16. Al Sarraj S, Bridges RR. p53 immunoreactivity in astrocytomas and its relationship to survival. *Br. J. Neurosurg.* 1995; 9: 143-149.
17. Kleihues P, Ohgaki H. Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol.* 1997; 7: 1131-1136.
18. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996; 6: 217-224.
19. Raghavan R, Steart PV, Weller RO. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1990; 16: 123-133.
20. Maiuri F, Stella L, Benvenuti D, Giamundo A, Pettinato G. Cerebral gliosarcomas: correlation of computed tomographic findings, surgical aspect, pathological features, and prognosis. *Neurosurgery* 1990; 26: 261-67.
21. Albrecht S, Connelly JH, Bruner JM. Distribution of p53 protein expression in gliosarcomas: a immunohistochemical study. *Acta Neuropathol. Berl.* 1993; 85: 222-226.

22. Boerman RH, Anderl K, Herath J, Borell T, Johnson N, Schaeffer-Klein J, Kirchhof A, Raap AK, Scheithauer BW, Jenkins RB. The glial and mesenchymal elements of liosarcomas share similar genetic alteration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996; 55: 973-981.
23. Bleggi-Torres LF, Noronha L, Vialle EN, Vaz LI, Ramina R, Ditzel L. Astrocitoma de células gigantes: estudo clínico, histológico e imuno-histoquímico. *J. Bras. Patol.* 1996; 33(1), 27-33.
24. Powell SZ, Yachnis AT, Rorke LB, Rojani AM, Eslin TA. Divergent differentiation in pleomorphic xantastrocytoma. Evidence for a neuronal element and possible relationship to ganglion cell tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20:80-85.
25. Burger PC, Rawlings CE, Cox EB, McLendon RE, Schold JR SC, Bullard DE. Clinicopathologic correlations in the oligodendroglioma. *Cancer* 1987; 59: 1345-1352.
26. Sung CC, Collins R, LI J, Pearl DK, Coons SW, Scheithauer BW, Johnson PC, Yates AJ. Glycolipids and myelin proteins in human oligodendrogliomas. *Glycoconj. J.* 1996; 13: 433-443.
27. Kros JM, Van Eden CG, Stefanko SZ, Waayer Van Batenburg M, Van Der Kwast TH. Prognostic implications of glial fibrillary acidic protein containing cell types in oligodendrogliomas. *Cancer* 1990; 66: 1204-1212.
28. Gottschalk J, Jautzke G, Paulus W, Goebel S, Cervos Navarro J. The use of immunomorphology to differentiate choroid plexus tumors from metastatic carcinomas. *Cancer* 1993; 72: 1343-1349.
29. Perentes E, Rubinstein LJ, Herman MM, Donoso L A- S-antigen immunoreactivity in human pineal glands and pineal parenchymal tumors. A monoclonal antibody study. *Acta Neuropathol. Berl.* 1986; 71: 224-227.
30. Bleggi-Torres LF, Reis Filho JS, Montemór Netto MR, Noronha L, Aléssio A, Carvalho Neto A. Ganglioglioma desmoplásico da infância – Estudo clínico, histopatológico e epidemiológico de cinco casos. *Arq. Neuro-Psiquiat.* 1998; 56 (3-A): 443-448.
31. Aida T, Abe H, Itoh T, Nagashima K, Inoue K. Desmoplastic infantile ganglioglioma – case report. *Neurol. Med. Chir. Tokyo* 1993; 33: 463-466.
32. Bleggi-Torres LF, Madalozzo LE, Werner B, Noronha L, Jacob GVV, Medeiros BC, Vialle EN. Meningeomas: estudo epidemiológico e anatomopatológico de 304 casos. *Arq. Neuro-Psiquiat.* 1996; 54 (4), 549-556.
33. Bleggi-Torres LF, Werner B, Reis-Filho JS, Cichon E. Hemangiopericitoma de meninge: relato de 10 casos. *Patologia (México)* 1996; 34 (2), 89-94.

11. HEMATOPATOLOGIA - ASPECTOS GERAIS

José Vassallo

É no tecido hemo-linfopoético e seus processos hiperplásicos e neoplásicos que se concentram grande parte dos problemas diagnósticos em Patologia, exigindo, freqüentemente, a utilização de métodos imuno-histoquímicos. Como em outros órgãos, um grande impulso tem sido dado no diagnóstico das lesões devido ao desenvolvimento de um crescente número de anticorpos que podem ser utilizados em tecido fixado rotineiramente e incluído em parafina⁽¹⁻⁹⁾. Porém, é neste tecido que a boa fixação e a boa técnica histológica são fatores críticos, precedendo a indicação do uso da imuno-histoquímica.

Neste capítulo, forneceremos noções de processamento adequado dos linfonodos biopsiados e das indicações para estudo imuno-histoquímico: no diagnóstico diferencial de neoplasias linfóides de outras neoplasias e no diagnóstico diferencial entre processos hiperplásicos e neoplásicos linfóides. O perfil imunofenotípico dos linfomas de células B, T e de Hodgkin serão estudados nos capítulos subseqüentes.

1. Processamento dos espécimes obtidos por biópsia

Cabe ao cirurgião a responsabilidade pela boa coleta do material para o diagnóstico em tecido linfóide. Nos serviços em que o trabalho conjunto com o patologista é estreito, este pode fornecer os princípios gerais para que o material coletado seja satisfatório. Onde o trabalho de equipe for rotineiro, é desejável que o patologista receba **imediatamente** o espécime a ser analisado para processá-lo nos moldes adequados. Onde isto não for possível, é imprescindível que, no mínimo, sejam obedecidos os seguintes cuidados:

- evitar biópsias de linfonodos submandibulares e inguinais, quando houver opção, uma vez que estes podem apresentar fibrose devida a drenagem de processos infecciosos pregressos; da mesma forma, quando houver linfonodos de tamanhos variados, deve-se optar pelo maior deles;
- deve-se evitar a fragmentação do linfonodo; no caso de biópsia de tumores, uma amostra profunda e adequada deve ser colhida, evitando-se representar apenas fibrose peri-tumoral;
- espécime deve ser cortado no maior eixo para a realização de "imprints", delicadamente, sendo necessárias pelo menos duas lâminas citológicas: uma para fixação imediata em álcool 80% e outra seca ao ar (para corantes hematológicos, como Giemsa ou Leishmann); então, o espécime deve ser imediatamente fixado em formalina a 10% e enviado para o patologista.

Nos casos em que o linfonodo for transportado de imediato ao laboratório de patologia, é conveniente colocá-lo em recipiente plástico, sem líquidos ou fixadores. Para tempo de transporte mais longo, o resfriamento a 4^o. C por até cerca de 24 horas permite boa preservação de antígenos e da morfologia. Idealmente, porém, os espécimes são transportados congelados em nitrogênio líquido para os centros especializados. Quando o

patologista recebe o espécime a fresco, o material pode ser dividido, segundo a capacidade do serviço em questão:

- para fixação em formalina a 10% e em outro fixador com boa preservação citológica (como B-5, Zenker, Bouin ou Duboscq-Brazil); para isto, as fatias devem ter espessura de 2-3 mm, permitindo melhor penetração do fixador. Jamais deve ser ultrapassado o tempo máximo adequado para cada fixador;
- para estudo citológico, idealmente uma ou mais lâminas feitas por "imprint" do espécime fixadas em álcool 80% e uma ou mais secas ao ar para coloração hematológica;
- congelamento de um fragmento de tecido para estudo imuno-histoquímico em cortes congelados e para estudos de biologia molecular (extração de DNA);
- retirada de fragmento para estudos microbiológicos (deverá ser acondicionado em meio de cultura);
- fragmento para microscopia eletrônica;
- realização de suspensão celular para imunofenotipagem em citômetro de fluxo.

Com raras exceções, em nosso meio o estudo fica restrito aos dois primeiros procedimentos rotineiros. Quando o patologista recebe o linfonodo já fixado, é conveniente que processe **imediatamente** as fatias de 2-3 mm de espessura e refixe o tecido em fixador de boa qualidade, caso as superfícies de corte revelem fixação incompleta. O cuidado na técnica histológica deve-se estender às etapas posteriores: produtos (álcool, xilol, parafina) de boa qualidade, tempo de banho adequado, corte e coloração adequados.

2. Diagnóstico diferencial entre neoplasias indiferenciadas hemo-linfopoéticas e outras

Este tópico será objeto de estudo em outros capítulos deste livro. Faremos aqui um breve apanhado dos principais grupos de neoplasias e padrões morfológicos que podem causar dificuldade diagnóstica.

- a) padrão indiferenciado de células grandes poligonais: entram neste grupo os carcinomas, melanoma, cordoma, sarcomas e linfomas de grandes células (principalmente o anaplásico de grandes células CD30-positivo, mas também os de grandes células B ou T);
- b) padrão indiferenciado de pequenas células redondas: entram neste grupo principalmente os carcinomas de pequenas células, tumores germinativos, linfomas (principalmente os linfoblásticos, tipo Burkitt, algumas vezes os de grandes células B e T), sarcoma granulocítico (infiltração por leucemia mielóide aguda) e os sarcomas indiferenciados (neuroblastoma, rabiomiossarcoma, Ewing/PNET). Menos freqüentemente este padrão ocorre no melanoma;
- c) padrão fusocelular: além de poder ocorrer em carcinomas, sarcomas e no melanoma, este padrão foi descrito, como forma rara, em linfomas anaplásicos de grandes células CD30-positivos.

Dependendo do padrão morfológico da neoplasia e da idade do paciente, alguns diagnósticos diferenciais são mais prováveis. Neste contexto, o painel deve incluir:

- **marcadores epiteliais:** pancitoqueratinas, citoqueratinas de alto e baixo pesos moleculares. Lembrar que o marcador para antígeno epitelial de membrana (EMA) pode ser positivo em neoplasias e células linfóides: linfoma de grandes células anaplásico CD30-positivo, linfoma de grandes células B, rico em linfócitos T, doença de Hodgkin predominância linfocitária nodular e em plasmócitos (e, eventualmente, em plasmocitomas). Deve-se ter em mente, por outro lado, que o marcador CD30 positivo em carcinomas embrionários, além de certas hiperplasias imunoblásticas ⁽¹⁰⁾.
- **marcadores para melanoma:** vimentina, proteína S-100 e HMB-45.
- **marcadores para tumores de células germinativas,** como a fosfatase alcalina placentária. Lembrar que alguns tumores germinativos podem ocorrer em mediastino, local acometido também por linfomas. Estudos imuno-histoquímicos em neoplasias indiferenciadas de testículo também devem incluir marcadores para neoplasias linfóides, tanto na faixa pediática (linfoma/leucemia linfoblástica), como em idade avançada (linfomas de grandes células B).
- **marcadores para sarcomas:** vimentina, marcadores miogênicos (desmina, actina muscular HHF-35, actina de músculo liso 1A4, actina sarcomérica e outros), marcadores endoteliais (fator VIII, BNH-9, CD31, CD34 e outros), marcadores neurais (enolase neuronal específica - NSE, cromogranina, CD57 e outros). Lembrar que o CD57 pode marcar neoplasias de células NK (natural killer), como também neoplasias não hematológicas (oligodendroglioma, tumores neuroectodérmicos, carcinoma de pequenas células do pulmão, carcinoma prostático). O CD99, utilizado para marcar sarcoma de Ewing/PNET é freqüentemente positivo em linfoma linfoblástico. Neste caso, é importante incluir no painel, além de outros marcadores linfóides, o TdT, atualmente utilizável em parafina, que é freqüentemente positivo em linfomas/leucemias linfoblásticas e, mais raramente, na leucemia mielóide aguda.
- **marcadores para neoplasias linfóides e mielo-histiocíticas:** CD45 (antígeno leucocitário comum), marcadores linfóides B (como o CD20/L26 e as cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas), marcadores linfóides T (como o CD45RO/UCHL1, CD43, CD3), marcadores mielóides e histiocitários (como a lisozima, mieloperoxidase, CD68/KP1), o CD15 e CD30 para a doença de Hodgkin e outros que serão estudados em maior detalhe nos capítulos seguintes.

Neste ponto, é conveniente detalhar um pouco mais o valor diagnóstico do **CD45** ^(11,12). Este é um marcador de grande importância no diagnóstico de linfomas, principalmente os de grandes células, quando outras neoplasias estão sendo cogitadas. Pode também estar presente no sarcoma granulocítico/leucemia mielóide aguda ⁽¹³⁾. Dependendo do tipo histológico, de 80-99% dos linfomas não-Hodgkin expressam o CD45. Na doença de Hodgkin esta expressão não ocorre de regra, com exceção do tipo predominância linfocitária nodular, que, como veremos adiante, é um tipo especial de neoplasia linfóide B ⁽¹⁴⁾. Mesmo assim, existem relatos de 3-9% de expressão do antígeno leucocitário comum nas formas clássicas da doença de Hodgkin. Na verdade, a avaliação da positividade das células de Hodgkin e Sternberg-Reed é difícil, uma vez que a expressão ocorre na membrana e linfócitos vizinhos podem simular positividade das mesmas.

Neoplasias não hematológicas raramente ou nunca expressam CD45, tornando-o um marcador fidedigno e **específico**. Sua **sensibilidade**, porém, pode variar, como afirmado pouco antes, de acordo com o tipo histológico do linfoma. Nos linfomas de grandes células anaplásicas CD30-positivos, em 40-50% dos casos pode deixar de haver sua expressão ⁽¹⁵⁾. Portanto, um painel que inclua apenas o CD45 e este for negativo pode nos levar à conclusão prematura de não se tratar de um linfoma. Assim, quando uma neoplasia indiferenciada não expressar os marcadores genéricos como citoqueratinas, proteína S100 e CD45, fica indicada a inclusão de marcadores linfóides B, T e o CD30 numa etapa seguinte. A **vimentina** pode ser positiva em qualquer neoplasia linfóide, bem como em pequenos linfócitos normais, servindo, também nestes casos, como controle de preservação dos antígenos teciduais (clone V9) ⁽¹⁶⁾. Vale lembrar que a proteína S100 pode ser fracamente positiva em linfomas de grandes células anaplásicas, além de ser mais evidentemente positiva em histiocitose de células de Langerhans (histiocitose X). Quando se avalia uma proliferação histiocitária, convém realizar a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, uma vez que estes também podem se marcar com o anticorpo para proteína S100.

A molécula CD45 está presente também na **membrana** de células normais precursoras e maduras, quer em sua forma não restrita, presente tanto em linfócitos B, quanto T, quer nas suas formas restritas, presente preferencialmente em linfócitos B (CD45RA/4KB5) ou T (CD45RO/UCLH1). Portanto, o marcador CD45 não se presta para diferenciar células normais de neoplásicas ou para subtipagem de linfomas não-Hodgkin.

3. Diagnóstico diferencial entre processos linfóides hiperplásicos e neoplásicos

O tecido linfóide maduro constitui-se por aproximadamente metade até $\frac{3}{4}$ de seus elementos de células linfóides T e $\frac{1}{4}$ até metade de células linfóides B. Esta proporção varia em condições onde há exuberante hiperplasia linfóide folicular, quando predominam os elementos linfóides B, e nas linfocitoses benignas reacionais em derrames pleurais, onde os elementos linfóides T perfazem 80% ou mais das células. Outras células imunologicamente competentes, como os macrófagos, constituem populações menores nos tecidos linfóides ⁽¹⁷⁾.

As células linfóides B expressam, em sua maioria, imunoglobulinas de superfície (slg) e, em alguns casos, como os plasmócitos, imunoglobulinas citoplasmáticas (clg). Uma mesma célula B pode expressar mais do que uma cadeia pesada de imunoglobulina (geralmente IgM e IgD), porém expressa apenas uma cadeia leve (kappa ou lambda). A proporção de células que expressam cadeias leves kappa e lambda é variável, porém aproxima-se de 2:1. Estes dados podem ser úteis no diagnóstico diferencial entre processos linfóides hiperplásicos e neoplásicos, uma vez que cerca de 70% das neoplasias linfóides B expressam slg monoclonal (apenas kappa ou apenas lambda). Num processo hiperplásico, o padrão de Ig é policlonal. As cadeias leves de imunoglobulinas podem ser detectadas por imuno-histoquímica ⁽¹⁸⁾.

Embora algumas vezes a detecção de slg seja possível em parafina, principalmente variando-se o tempo de digestão enzimática do corte, os melhores resultados são obtidos na detecção de clg. Mesmo quando dispomos de tecido congelado, há limitações na pesquisa de restrição de cadeias leves de imunoglobulinas:

- a) devido à presença de Ig no interstício;

- b) porque cerca de 1/3 dos linfomas de células B não expressam Ig de superfície e citoplasmática;
- c) pela possibilidade de existirem células B policlonais reativas remanescentes no tecido neoplásico.

Outro problema técnico que pode advir do uso da imuno-histoquímica para a pesquisa de cadeias leves de imunoglobulinas citoplasmáticas é a adsorção ou difusão das mesmas para o citoplasma de quaisquer células, fornecendo resultados falso positivos. Este problema pode ser contornado com a utilização de **hibridização in situ**, através de sondas marcadas para detectar o RNA mensageiro das cadeias leves de Ig. Neste caso, as células positivas de fato contêm o RNA para kappa ou lambda, não havendo o artefato de difusão ou adsorção possível com as proteínas. Este método é perfeitamente aplicável a cortes parafinados ⁽¹⁹⁾.

Quanto à avaliação de neoplasias de células T, a simples presença de grande número de linfócitos T não é sempre indicativa de malignidade desta linhagem celular, como pode ser observado no linfoma de grandes células B, rico em linfócitos T. Além disto, populações T reativas benignas podem infiltrar neoplasias T, levando a falhas de interpretação à imunofenotipagem. Por fim, um marcador de clonalidade detectável por imuno-histoquímica, a exemplo das cadeias leves de Ig, ainda não está disponível para a linhagem linfóide T.

Neste contexto entende-se a necessidade de métodos mais complexos em alguns casos, através da Biologia Molecular.

4. Princípios das aplicações dos métodos de Biologia Molecular em Hematopatologia

Os métodos de Biologia Molecular aplicados à Hematopatologia incluem, além da hibridização in situ citada acima, o método de hibridização de Southern blot e o método de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ^(20,21). Em ambos, é necessário que o DNA do tecido seja extraído, perdendo-se assim o parâmetro morfológico. Ambos os métodos aplicam-se para o diagnóstico de neoplasia linfóide, para a tipagem das neoplasias em B ou T (não há possibilidade deste método ser utilizado para a subtipagem da neoplasia), para a detecção de clones neoplásicos B ou T, que não possam ser identificados morfológicamente (acometimento parcial do tecido, interposição de tecido reacional residual, identificação de doença residual após terapêutica).

O método de Southern blot requer uma certa quantidade de DNA de boa qualidade, portanto não pode ser aplicado em material previamente fixado e incluído em parafina. Por isto, fragmentos de tecido ou suspensão de células obtidos especificamente para este fim são necessários. Suas vantagens incluem:

- determinação da clonalidade da proliferação, independente da expressão imunofenotípica, já que avalia a carga genética e não a expressão protéica dos marcadores linfóides;
- determinação da natureza maligna ou benigna de um processo, independente da morfologia, já que pode detectar de 1 a 2% de população neoplásica em uma amostra;
- portanto, permite aplicação em pequenas amostras de fluidos, sangue e aspirados;

- resolve a maior parte das limitações da imunofenotipagem listadas anteriormente.

As limitações deste método podem ser técnicas ou biológicas:

- processamento de extração, digestão do DNA e hibridização com sonda marcada radioativamente requer cerca de 2 semanas, retardando o tratamento adequado,
- produz resíduos radioativos, por causa da marcação das sondas diagnósticas;
- pode fornecer resultados falso-positivos ou falso-negativos por processamento inadequado do DNA e das demais etapas da hibridização;
- além disto, a detecção de um rearranjo genético clonal de um receptor pode não ser necessariamente indicativo de malignidade (p. ex., proliferações clonais na AIDS, em pseudo-linfomas extra-nodais, em linfoproliferações cutâneas) ⁽²²⁾;
- nem todas as neoplasias contêm necessariamente o rearranjo genético clonal que se está pesquisando através de dada sonda;
- não fornece informações sobre subclassificações, sobre comportamento clínico ou prognóstico.

Da mesma forma que a imunofenotipagem, os métodos de biologia molecular devem ser interpretados dentro de um contexto clínico e morfológico ⁽²³⁾!

Por se tratar de um método que permite a amplificação de cópias de uma seqüência gênica, o método de PCR contorna algumas das limitações do Southern blot. Através da amplificação pelo PCR pode-se estudar tecidos processados rotineiramente, já que quantidades mínimas de DNA de boa qualidade são necessários. Além disto, todo o processamento dura apenas alguns dias, permitindo aplicação clínica mais rotineira. No entanto, por ser tão sensível, o risco de contaminação e de resultados falso-positivos são muito maiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hsu S-M, Zhang H-Z, Jaffe ES. Utility of monoclonal antibodies directed against B and T lymphocytes and monocytes in paraffin-embedded sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 1983; 80: 415-420.
2. Andrade R E, Wick M R, Frizzera G, Gajl-peczalska K J. Immunophenotyping of hematopoietic malignancies in paraffin sections. *Hum. Pathol.* 1988; 19: 394-402.
3. Norton A J, Isaacson P G. Lymphoma phenotyping in formalin-fixed and paraffin wax-embedded tissues. I. Range of antibodies and staining patterns. *Histopathol.* 1989; 14: 437-446.
4. Davey F R, Elghetany M T, Kurec A S. Immunophenotyping of hematologic neoplasms in paraffin-embedded tissue sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990; 93(suppl.1): S17-S26.
5. Segal G H, Stoler M H, Fishleder A J, Tubbs R R. Reliable and cost-effective paraffin section immunohistology of lymphoproliferative disorders. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991; 15: 1034-1041.
6. Cabeçadas J M, Isaacson P G. Phenotyping of T-cell lymphomas in paraffin sections - which antibodies? *Histopathol.* 1991; 19: 419-424.
7. Perkins S L, Kjeldsberg C R. Immunophenotyping of lymphomas and leukemias in paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; 99: 362-373.
8. Chetty R, Gatter K. CD3: structure, function and role of immunostaining in clinical practice. *J. Pathol.* 1994; 173: 303-3-7.
9. Chadburn A, Knowles D M. Paraffin-resistant antigens detectable by antibodies L26 and polyclonal CD3 predict the B- or T-cell lineage of 95% of diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102: 284-291.
10. Segal G H, Kjeldsberg C R, Smith G P, Perkins S L. CD30 antigen expression in florid immunoblastic proliferations. A clinicopathologic study of 14 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102: 292-298.
11. KURTIN P J, Pinkus G S. Leukocyte common antigen - a diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Hum. Pathol.* 1985; 16: 353-365.
12. Weiss L M, Arber D A, Chang K L. CD45: a review. *Applied Immunohistochem.* 1993; 1: 166-181.
13. Vassallo J, Altemani A M, Cardinali I A, et al. Granulocytic sarcoma of the larynx preceding chronic myeloid leukemia. Report of one case. *Pathol. Res. Pract.* 1993; 189: 1084-1086.
14. Diebold J, Jungman P, Molina T, Audouin J. Recent advances in Hodgkin's disease: an overview and review of the literature. *Current Diag. Pathol.* 1995; 2: 153-162.
15. Falini B, Pileri S, Stein H, et al. Variable expression of LCA (CD45) in CD30 (Ki-1) positive anaplastic large cell lymphoma: implications for differential diagnosis between lymphoid and nonlymphoid malignancies. *Hum. Pathol.* 1990; 21: 624-629.
16. Leong A S-Y. *Applied Immunohistochemistry for the Surgical Pathologist.* Edward Arnold, London, p. 26, 1993.
17. Knowles D M. Immunophenotypic and immunogenotyping approaches useful in distinguishing benign and malignant lymphoid proliferations. *Sem. Oncol.* 1993; 20: 583-610.
18. Ashton-Key M, Jessup E, Isaacson P. Immunoglobulin light chain staining in paraffin-embedded tissue using a heat mediated epitope retrieval method. *Histopathol.* 1996; 29: 525-531.
19. Ruprai A K, Pringle J H, Angel C A, et al. Localization of immunoglobulin light chain mRNA expression in Hodgkin's disease by in situ hybridization. *J. Pathol.* 1991; 164: 37-40.
20. Griesser H. Applied molecular genetics in the diagnosis of malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Diagn. Mol. Pathol.* 1993; 2: 177-191.
21. Slack D N, McCarthy K P, Wiedemann L M, Sloane J P. Evaluation of sensitivity, specificity and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn. Mol. Pathol.* 1993; 2: 223-232.

22. Collins R D. Is clonality equivalent to malignancy: specifically, is immunoglobulin gene rearrangement diagnostic of malignant lymphoma? *Hum. Pathol.* 1997; 28: 757-758.
23. Rockman S P. Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia* 1997; 11: 852-862.

Até recentemente, a análise imunofenotípica em secções de tecidos incluídos em parafina era de pouca ajuda e, conseqüentemente, raramente empregada no diagnóstico imuno-histoquímico das neoplasias hematolinfóides. Atualmente com a disponibilidade de numerosos anticorpos monoclonais, reativos contra epítotopos de células linfóides resistentes à formalina, a maioria dos problemas diagnósticos dos linfomas não Hodgkin originários de linfócitos B, pode ser resolvida utilizando cortes de tecidos desparafinados.

PRINCIPAIS MARCADORES DE LINFÓCITOS B EM TECIDOS INCLUÍDOS EM PARAFINA

Anticorpos para cadeias leves de imunoglobulinas kappa e lambda - Estes anticorpos apresentam valor limitado na análise de linfomas em tecidos desparafinados⁽¹⁾. Na maioria dos linfomas B, a imunoglobulina é relacionada com a superfície celular, sendo, por isso, sua estrutura comprometida durante o processamento histológico. Além disso, o elevado *background* causado pela presença de imunoglobulina no interstício do tecido embebido em soro, dificulta a interpretação da reatividade para cadeias leves kappa e lambda. Nos linfomas com diferenciação linfoplasmocitóide e nas neoplasias de plasmócitos, que apresentam maior quantidade de imunoglobulina intracitoplasmática, a utilização destes marcadores pode ser extremamente útil para demonstrar monoclonalidade e, portanto, comprovar a natureza neoplásica do processo.

CD20 - O anticorpo monoclonal anti-linfócito B mais útil é o anticorpo L26, que identifica o antígeno CD20, que apresenta, com raras exceções, expressão restrita às células linfóides B normais, reativas e neoplásicas^(2,3). A grande maioria (>95%) dos linfomas de células B é CD20 positivo; a freqüência de linfomas de células T CD20 positivos é praticamente zero. Além disso, o CD20 é expresso em células de Reed-Sternberg e suas variantes em 10-20% dos casos de Doença de Hodgkin clássica; as células L&H do sub-tipo predominância linfocítica da Doença de Hodgkin são sistematicamente CD20 positivas. Neoplasias de células plasmocitárias são, em geral, negativas para CD20. Deve se salientar que o anticorpo L26 não apresenta boa reatividade em tecidos descalcificados com ácido e em particular tecidos fixados com Bouin.

Outros anticorpos monoclonais anti-células B incluem 4KB5 ou MB1 (anti-CD45R), LN-1 (anti CD75w) e LN2 ou MB3 (anti-CD74), no entanto, deve se ressaltar que nenhum destes anticorpos apresenta a sensibilidade e especificidade do anticorpo L26 no diagnóstico dos linfomas de células B.

CD79a - Na superfície de células B, o antígeno CD79a aparece antes dos estádios pré-B de diferenciação dos linfócitos B e persiste nas células plasmocitárias. Conseqüentemente CD79a identifica espectro mais amplo de diferenciação de linfócitos B

que aqueles reconhecidos pelo anticorpo anti-CD20. Recentemente, foi desenvolvido anticorpo anti-CD79a que funciona em tecido desparafinado e que reconhece 97% dos linfomas B. é aconselhável a utilização deste anticorpo junto com anticorpo anti-CD20 no diagnóstico imuno-histoquímico dos linfomas de células B ⁽⁴⁾.

OUTROS MARCADORES ÚTEIS NO DIAGNÓSTICO DOS LINFOMAS B

CD23 - CD23 é marcador de ativação de células B sendo comumente expresso em leucemia linfocítica crônica (LLC)/linfoma linfocítico. é útil na diferenciação entre LLC e linfoma de células do manto por citometria de fluxo. Recentemente, há disponível comercialmente anticorpo contra CD23 com imunorreatividade em tecido incluído em parafina. Estudos preliminares em material histológico têm demonstrado utilidade semelhante na sub-classificação dos linfomas B ⁽⁵⁾.

CD5 - Recentemente dispomos de um novo anticorpo anti-clone CD5, designado 4C7 com imunorreatividade em tecido incluído em parafina. Este anticorpo identifica população de linfócitos T maduros e neoplasias de células B que co-expressam CD5, tais como, LLC/linfoma linfocítico e linfoma de células do manto ⁽⁶⁾.

Ciclina D1 - A proteína nuclear PRAD1 ou ciclina D1 foi originalmente descrita em adenomas de paratireóide e está envolvida no controle da transição da fase G1 para fase S do ciclo celular. A expressão exagerada de ciclina D1 é característica dos linfomas de células do manto devido, em parte, à presença da translocação t(11,14) que envolve o *locus* da cadeia pesada de imunoglobulina e do gene da ciclina D1. Conseqüentemente, a presença de ciclina D1 é útil como marcador de linfoma de células do manto e auxilia na sua distinção entre os linfomas B de baixo grau ^(7,8).

bcl-2 - O produto do gene *bcl-2* é uma proteína de membrana mitocondrial de 26kD que apresenta papel chave na prevenção da morte programada da célula ou apoptose em uma variedade de células hematopoéticas, incluindo linfócitos T e B. O linfoma folicular caracteristicamente contém t(14,18), que ocorre no locus *bcl-2* sob o controle de elementos regulatórios de imunoglobulina de cadeia pesada. A expressão da proteína *bcl-2* pode ser detectada por imuno-histoquímica em várias neoplasias linfóides. O anticorpo monoclonal anti-*bcl-2* é utilizado para diferenciar linfoma folicular de hiperplasia folicular. Em 93% dos linfomas foliculares a imunorreatividade para *bcl-2* pode ser encontrada nas células foliculares; a negatividade é encontrada nos centros germinativos das hiperplasias foliculares reacionais. Outros linfomas de células B de baixo grau também expressam *bcl-2* ^(9,10).

LINFOMAS ORIGINÁRIOS DE CÉLULAS B

Linfoma linfoblástico de células B/Leucemia linfoblástica aguda B - Neoplasia de células B precursoras (blásticas) com apresentação na forma de leucemia linfoblástica aguda pré-B e linfoma linfoblástico. Esta distinção é geralmente clínica. Em cortes de parafina, os linfomas linfoblásticos-B/LLA-B são positivos para vários marcadores

associados às células B, incluindo CD79a e CD20 (50% dos casos) ⁽⁴⁾, além de expressarem CD10/CALLA, CD34 e TdT, marcador de célula precursora linfoblástica.

Linfoma de Burkitt e linfoma Burkitt-like - Expressam vários antígenos associados às células B, como CD20, CD79a, em parafina. As células tumorais são também positivas para CD10/CALLA, mas negativas para CD34, TdT, CD43 e para antígenos associados a linfócitos T ⁽¹¹⁾.

Linfoma folicular - Neoplasia de células B originadas de células centro-foliculares, usualmente constituído de mistura de centrocitos e centroblastos. Os folículos neoplásicos expressam CD20 e CD79a e são rodeados por pequenos linfócitos T, CD3+. Para o patologista o anticorpo mais útil para diferenciar linfoma folicular de hiperplasia linfóide reativa é o anticorpo *bcl-2* ^(10,12). Os folículos neoplásicos são positivos para *bcl-2* em 85% dos casos, em contraste com os folículos reacionais da hiperplasia linfóide que são negativos para *bcl-2*. Os linfomas foliculares apresentam baixo índice de proliferação celular detectado através do anticorpo Ki-67 (MIB-1), enquanto os folículos reativos apresentam índice elevado de células em proliferação. Os casos de linfoma folicular de diagnóstico mais difícil necessitam de estudo imuno-histoquímico em tecido congelado, com o objetivo de detectar a expressão monoclonal para cadeia leve de imunoglobulina, observada em 90% dos casos, geralmente de IgG e I gM. Os linfomas foliculares são positivos para CD10 e negativos para CD5 e CD43, que auxiliam no diagnóstico diferencial com linfoma de células do manto e linfoma linfocítico/LLC.

Leucemia linfóide crônica/Linfoma linfocítico de células B - Estas neoplasias linfóides são constituídas por pequenos linfócitos com núcleo escuro, com áreas claras que correspondem a acúmulos de grandes células tipo centroblastos e imunoblastos denominados centro proliferantes. Células neoplásicas expressam os marcadores de linfócitos B, CD20 e CD79a. Em contraste com linfócitos normais, as células tumorais co-expressam CD5 e CD43 ^(13,14), antígenos detectáveis em material incluído em parafina. O índice de proliferação celular é geralmente bastante baixo nestas neoplasias, com positividade marcada apenas nos acúmulos de grandes células dos centros proliferantes.

Linfoma linfoplasmacítico (Imunocitoma) - Estes linfomas B constituem-se em proliferação predominante de pequenos linfócitos, freqüentemente apresentando inclusões intranucleares, conhecidas como corpúsculos de Dutcher, acompanhados de variável número de células plasmocitárias. As células plasmocitárias apresentam imunoglobulina monotípica IgM intracitoplasmática detectável nos cortes em parafina. Além disso são positivas para CD20 e CD79a e geralmente são negativas para CD5, CD10 e CD23. A expressão de CD43 é variável. O índice de proliferação celular é bastante baixo (<5% das células).

Linfoma de células do manto - Neoplasia de pequenas células recentemente reconhecida na classificação REAL, mas que se caracteriza por comportamento agressivo e prognóstico ruim ⁽¹¹⁾. O linfoma de células do manto apresenta padrão

vagamente nódular e constituído por células de pequeno e médio tamanhos do tipo centrocitos. Nota-se hiperplasia de células reticulares dendríticas que pode ser demonstrada pela positividade dos anticorpos CD21 e CD35. Esses linfomas expressam marcadores de células B (CD20 e CD79a) em cortes de parafina. Também costumam apresentar expressão monotípica de imunoglobulina de superfície (IgM+IgD) demonstradas em tecido congelado. Os linfomas de células do manto co-expressam CD43 e CD5, mas são negativos para CD23 e CD10. Anticorpos anti ciclina-D1 se constituem nos marcadores mais úteis para o diagnóstico de linfoma de células do manto. Aproximadamente 60% destes linfomas são ciclina-D1 positivos ⁽¹⁵⁾. Há necessidade de se alertar para dificuldades de interpretação das reações utilizando anticorpo anti-ciclina D1. Apenas coloração fortemente positiva na maioria dos núcleos das células tumorais deve ser considerado como resultado positivo e coloração citoplasmática não tem valor diagnóstico.

Linfoma B de zona marginal extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma do tipo MALT) - Linfomas do tipo MALT são compostos de pequenas células atípicas do tipo centrocitos, mas com citoplasma mais abundante. Outras células invariavelmente presentes são células B-monocitóides, plasmócitos e pequenos linfócitos. Caracteristicamente observam-se células linfóides atípicas infiltrando o epitélio (lesão linfoepitelial). As células tumorais expressam antígenos associados às células B, como CD20, CD79a, mas são tipicamente negativas para CD5, CD43 e CD23 (excluindo os diagnósticos de LLC e linfoma de células do manto) e negativas para CD10 (excluindo linfoma folicular). O uso de anticorpos anti-citoqueratinas é bastante útil nestes linfomas para demonstrar a presença de lesão linfoepitelial. Em aproximadamente 40% dos casos as células plasmocitárias apresentam expressão monoclonal de imunoglobulina (IgM, IgG ou IgA). O *Helicobacter pylori* pode ser encontrado na maioria dos casos de MALT gástrico ⁽¹¹⁾.

Linfoma B de zona marginal nodal (Linfoma B monocitóide nodal) - Atualmente é bem aceita a existência do linfoma B de zona marginal nodal independente da existência de linfoma do tipo MALT. O imunofenótipo destas linfomas é bastante semelhante dos descritos para linfoma do tipo MALT.

Linfoma B rico em células T - Estes linfomas são definidos pela presença de pequeno número de células neoplásicas B entre população predominante de linfócitos T reacionais. As células tumorais são grandes, do tipo centroblastos e imunoblastos, fortemente positivas para CD20 e CD79a e geralmente são positivas para EMA. Marcadores de células de Reed-Sternberg (CD15 e CD30) são negativos. Linfócitos pequenos não-neoplásicos expressam imunofenótipo T. Estes linfomas geralmente se apresentam como estágio III e IV no momento do diagnóstico e a resposta à quimioterapia é bastante variável ⁽¹⁶⁾.

Linfoma difuso de grandes células B - Os achados morfológicos deste tipo de linfoma é bastante variado, por vezes constituído predominantemente de centroblastos ou imunoblastos ou ainda de grandes células pleomórficas, com núcleos irregulares, lobados

ou multilobulados. Frequentemente esses tumores apresentam mistura de todos esses tipos celulares. Os linfomas de grandes células, independente dos aspectos morfológicos, expressam vários marcadores de linfócitos B, como CD20 e CD79a, e são positivos para CD19 e CD22 em material congelado. Expressão monoclonal de imunoglobulina citoplasmática pode ser demonstrada em cortes de parafina em razoável proporção dos casos. Esses linfomas são, na grande maioria, positivos para CD45, marcador útil no diagnóstico diferencial com carcinomas indiferenciados e melanoma. Esses linfomas são considerados linfomas de alto grau histológico e geralmente apresentam índice de proliferação celular acima de 60% utilizando anticorpo Ki-67 ^(11,17).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Norton AJ, Isaacson PG. Detailed phenotypic analysis of B-cell lymphoma using a panel of antibodies reactive in routinely fixed wax-embedded tissue. *Am. J. Pathol.* 1987; 128:225-40.
2. Mason DY, Comans-Bitter WM e cols. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell associated CD20 antigen. *Am. J. Pathol.* 1990; 136:1215-22.
3. Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely and paraffin wax embedded tissues. *J. Clin. Pathol.* 1987; 40:1405-12.
4. Mason Dy, Cordell JL, Brown MH e cols. CD79a: A novel marker for B-cell neoplasm in routinely processed tissue samples. *Blood* 1995; 86: 1453-9.
5. Kumar S, Green GA, e cols. Use of CD23 (BU38) on paraffin sections in the diagnosis of small lymphocytic lymphoma and mantle cell lymphoma *Mod. Pathol.* 1996; 9:925-9.
6. Kauffman O, Flath B e cols. Immunohistochemical detection of CD5 with monoclonal antibody 4C7 in paraffin sections. *Am J. Clin. Pathol.* 1997; 108:669-73.
7. de Boer CJ, Schuurin E e cols. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 86:1995, 2715-23.
8. Zukerberg LR, Yang WI , Arnold A, Harris NL. Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. Detection by immunohistochemistry. *Am J. Clin. Pathol.* 1995; 103:756-60.
9. LeBru DP, Kamel OW e cols. Follicular lymphomas of the gastrointestinal tract. Pathologic features of 31 cases and bcl-2 oncogenic protein expression. *Am. J. Pathol.* 1992; 140:1327-35.
10. Wood BL, Bacchi MM, Bacchi CE, Kidd P, Gown AM. Immunocytochemical differentiation of reactive hyperplasia from follicular lymphoma using antibodies to cell surface and proliferation-related markers. *Appl. Immunohistochem.* 1994; 2:48-53.
11. Harris NL, Jaffe ES e cols. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Study Group. *Blood* 1994; 84:1361.
12. Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein detection for hisitopathologists? *Histopathology* 1995; 26: 89.
13. Arber DA, Weiss LM. CD5: A review. *Appl. Immunohistochem.* 1995; 3:1.
14. Arber DA, Weiss LM. CD43: A review. *Appl. Immunohistochem.* 1993; 1:88.
15. Brynes RK, McCourty A e cols. Demonstration of cyclin D1(BCL-1) in mantle cell lymphoma. Enhanced staining using heat and ultrasound epitope retrieval. *Appl. Immunohistochem.* 1997; 5:45.
16. McBride JA Rodriguez J e cols. T-cell rich B-cell lymphoma simulating lymphocyte rich Hodgkin's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20:193.
17. Grogan TM Lippman SM e cols. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphoma as deteminated by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1998; 71:1157.

13. LINFOMAS NÃO HODGKIN DE CÉLULAS T

Fernando Augusto Soares e Victor Eduardo Arrua Arias

INTRODUÇÃO

O conhecimento acerca dos linfomas não-Hodgkin de células T (LNH-T) é muito menos amplo do que aquele referente aos linfomas de células B. Até há pouco tempo, debatia-se a importância do reconhecimento do imunofenótipo para o tratamento e prognóstico. Este debate não mais tem lugar, sendo hoje aceita universalmente a necessidade imperativa da separação dos linfomas de células B, T ou *natural killer* (NK) ⁽¹⁾. Esta é a chave primária no sistema REAL, e mesmo já era reconhecida nos sistemas de Kiel e Lukes e Collins. O sistema da *Working Formulation* não prevê tal separação e esta tornou-se uma das críticas mais fortes para a não utilização deste sistema, que em nossa opinião, deve ser abandonado por clínicos e patologistas.

Os LNH-T são de reconhecimento muito mais recente do que sua contraparte de células B, correspondem a cerca de 12% de todos os linfomas não-Hodgkin em nosso meio e têm nomenclatura ainda muito confusa. A nomenclatura ficou um pouco mais clara no sistema REAL, que separou os LNH-T em 10 entidades diferentes, com algumas subdivisões ainda provisórias ⁽¹⁾. Esta classificação pode ser vista na tabela 1. Pela simples observação da listagem, pode-se notar que os critérios de separação destas entidades constituem uma miscelânea, sendo ora etiológicos (LNH-T associado ao HTLV-1), ora decorrentes de aspectos clínicos (LNH-T associado a enteropatia), da localização topográfica (LNH-T hepato-esplênico ou paniculítico) da simples observação histopatológica (linfoma de Lennert), ou ainda expressão imunofenotípica (anaplásico de grandes células CD30 positivo). Isto sem falar da inclusão das neoplasias originadas de células NK.

Os LNH-T representam um grande número de neoplasias, definidas imunologicamente como constituídos por células T ativadas e com imunoexpressão aberrante. Podemos dividi-los em periféricos ou centrais. Também o termo LNH-T periférico traz significativas confusões, pois este nome nada tem a ver com o sítio de envolvimento, mas sim com o grau de maturação das células T. Desta forma, os LNH-T periféricos são aqueles constituídos por células com imunofenótipo mais maduro, enquanto que os tímicos são compostos de células precursoras (leucemias agudas/linfomas).

Este capítulo irá abordar como podemos marcar por métodos imuno-histoquímicos os LNH-T. Nos capítulos que nos antecederam, a abordagem geral das neoplasias linfóides foi comentada e, portanto, este capítulo irá abordar a situação onde o patologista já sabe que se trata de um infiltrado celular T. Não nos preocuparemos em comentar a separação entre linfomas B e T, exceto quando estritamente pertinente. Para entendermos a marcação que iremos realizar na prática, tentaremos explicar resumidamente a ontogenia das células T e NK, pois seu conhecimento é fundamental para se entender os marcadores utilizados na prática diária.

A ONTOGENIA DAS CÉLULAS T

Um assunto penoso e nem sempre bem estudado pelos patologistas é a ontogenia das células. Mas para se entender linfomas e toda a gama de marcadores utilizados, este

capítulo é de fundamental importância. Muitas vezes nos perguntam como podemos decorar todos os CDs, mas isto é muito simples se acompanharmos como a maturação dos linfócitos ocorre e relacionarmos com a expressão destas moléculas. Nesta seção comentaremos somente a ontogenia dos linfócitos T/NK, deixando a análise dos linfócitos B para seu respectivo capítulo. Infelizmente não há como dissertar extensamente sobre o assunto neste texto e sugerimos que os artigos especializados sejam consultados para maiores detalhes.

Os linfócitos T sofrem um processo específico de seleção no timo. Os receptores de células T (TCR) permitem que os linfócitos T realizem sua função imunológica. Diferentemente das imunoglobulinas, os TCRs não reconhecem antígenos solúveis e interagem com antígenos ligados a moléculas de apresentação antigênica, os complexos de histocompatibilidade (MHC). As moléculas de TCR são associadas a uma variedade de outras moléculas de superfície como o CD3, CD45, CD4 ou CD 8, receptores de integrinas e outras. A ligação com estes receptores é fundamental na resposta imune celular. A ligação com um antígeno específico leva à transformação do linfócito T em célula blástica e inicia a sua expansão clonal. Populações diferentes de linfócitos T têm diferentes funções. Células CD8 positivas medeiam a citotoxicidade contra vírus, interagindo com células que têm MHC do tipo I, enquanto que células CD4 positivas interagem com células, contendo MHC do tipo II e funcionam como células auxiliares (*helper*) na regulação de outras respostas celulares.

Os TCRs são polipeptídeos heterodímeros ligados por pontes dissulfeto. São constituídos principalmente por cadeias α - β , mas cerca de 5-10% dos TCR são constituídos por cadeias γ - δ . As cadeias dos TCR têm uma grande diversidade de rearranjos aleatórios de genes para regiões V (variáveis), D (de diversidade) e J (de junção). Juntos, estes segmentos gênicos codificam o domínio extracelular V do TCR que fazem a ligação com as moléculas de MHC. Os TCRs são ligados de maneira não covalente ao complexo do CD3, que é o responsável pela transdução do sinal após o estímulo antigênico. A regulação do mecanismo bioquímico de ativação da célula T é fascinante, mas foge ao escopo do texto e sugerimos que maiores detalhes sejam verificados nos artigos específicos.

Precocemente na fase embrionária, os precursores das células T migram da medula óssea para o timo, o que induz a diferenciação para células mais maduras, os linfócitos T periféricos. O fígado fetal contém pré-timócitos com positividade para CD3 intracitoplasmático (cCD3) a partir da sétima semana gestacional. Virtualmente todos os timócitos corticais expressam a enzima transferase do deoxinucleotidil terminal (Tdt) e têm aspecto morfológico de células blásticas e alto índice proliferativo. A maturação ocorre quando estas células migram para a posição subcapsular, deixando o timo para tornar-se um linfócito T periférico. À medida que esta maturação acontece, há uma expressão sequencial de antígenos, o que permite o reconhecimento da fase de maturação da célula T.

O primeiro antígeno que tem expressão é o CD7 e está presente mesmo antes do TCR estar completamente formado. A presença de Tdt e CD7, sem outros antígenos é característica de pró-timócitos, que correspondem a cerca de 10% de toda população linfóide tímica. Os timócitos de estágio II, denominação que inclui os timócitos corticais e subcapsulares, correspondem a cerca de 75-80% das células e são caracterizados pela expressão de CD7, CD2, CD1 e CD5 e co-expressão (ou ausência) de CD4 e CD8. Nesta fase o CD3 é intracitoplasmático. Esta molécula, como já comentado, é extremamente importante, pois é ela que irá se ligar ao TCR quando passar a ter expressão de membrana. Isto ocorre nos timócitos medulares (ou estágio III). A célula expressa ou só

CD4 ou só CD8, além de CD7, CD2 e CD5, caracterizando o imunofenótipo maduro. Neste momento não temos mais a expressão de CD1 ou Tdt e o TCR está com as suas cadeias prontas. Estas células ganham, então, a circulação, onde constituem cerca de 65-80% dos linfócitos.

O conhecimento desta seqüência é muito importante, pois, diferentemente de outras neoplasias, **a expressão anômala de antígenos linfocitários pode ser um excelente indicador de malignidade.** Infiltrados linfóides reacionais sempre terão, dentre os linfócitos, células CD4+ e células CD8+. A expressão de células somente de um tipo (CD4 ou CD8) é altamente indicativo de malignidade. Assim também o é a chamada expressão anômala de antígenos. A perda do CD7 ou CD5, principalmente, são outros bom indicativos que aqueles linfócitos T são malignos. Em cerca de 70% dos linfomas T periféricos há perda de pelo menos um antígeno. Em nossa opinião este é um aspecto extremamente útil na marcação de lesões linfóides cutâneas e temos utilizado este conceito com freqüência. Também a presença de Tdt em tecidos não-tímicos é quase sinônimo de linfomas linfoblásticos. Lembrar que este critério não é válido para lesões mediastinais.

PAINEL DE MARCAÇÃO DAS CÉLULAS T

Uma vez feito o diagnóstico de LNH é obrigatório que seja feita imunofenotipagem. Raras são as ocasiões nas quais podemos dispensar o estudo imuno-histoquímico. Geralmente linfomas completamente nodulares, sem áreas difusas, podem ser a exceção à regra do exame imuno-histoquímico, e praticamente desconhecemos outra situação em que isto possa ocorrer nos casos de LNH.

Temos utilizado para escrutínio entre LNH de células B e T/NK a combinação de 2 marcadores de células B (CD20 e CD79a) e 3 outros para a marcação de células T (CD45RO, CD43 e CD3). A combinação dos anticorpos respectivos permite conclusões bastante definitivas, exceto para neoplasias de células precursoras, cujo imunofenótipo seja muito imaturo. Os antígenos citados são característicos de células maduras. Os LNH de células imaturas (linfoblásticos) são a minoria, têm quadro histológico característico e apresentações clínicas bem definidas. Não discutiremos este painel para células B, uma vez que a expressão destes antígenos já foi discutida no capítulo correspondente.

Um antígeno que deve ser obrigatoriamente pesquisado neste painel básico é o CD45RO (UCHL1). Ele reconhece especificamente uma isoforma de CD45, de 180kd. Esta glicoproteína está presente na maioria dos timócitos e células T ativadas, em muito maior proporção do que as células T normais em repouso. Reconhece ambas as subpopulações, CD4 e CD8. Granulócitos e macrófagos podem ser marcados pelo UCHL1, mas grande parte das células B e NK são negativas. A grande maioria dos linfomas B não expressam CD45RO, com exceção de alguns linfomas de células do manto. Um anticorpo muito semelhante ao UCHL1 é o OPD4, cuja diferença básica é que este último não marca células da linhagem histiocitária. Também pertence à família CD45RO e aparentemente marca melhor a subpopulação CD4.

Ainda dentro deste painel básico, é muito importante o anticorpo Leu22, que marca o antígeno CD43. Outro anticorpo que reconhece o CD43 é o MT1. Ambos se sobrepõem ao UCHL1/OPD4, marcando células T e linfomas originados destas células. Na verdade, seu espectro de marcação é mais amplo do que aquele do UCHL1/OPD4, mas tem a desvantagem de marcar cerca de 25% dos linfomas B, sendo que esta marcação anômala é mais fraca com o MT1 do que com o L22. Realçamos que a co-expressão CD20/CD43 é fortemente indicativa de malignidade.

Finalmente, no painel básico utilizamos o CD3 policlonal. O antígeno CD3 é um dos mais bem caracterizados biologicamente. Sua molécula consiste de 5 polipeptídeos pequenos, com peso molecular de 16-28kd. Estas 5 cadeias são designadas de γ , δ , ϵ , ζ e η . A grande maioria dos anticorpos monoclonais disponíveis reagem contra a cadeia ϵ (épsilon), de 20kd. O CD3 está associado ao TCR na superfície linfocitária. Acredita-se que o CD3 seja o responsável pela transmissão do sinal para a célula quando do reconhecimento antigênico pelo TCR, mediada pelo complexo enzimático tirosinafosfatase. Na ontogenia das células T o CD3 é precocemente detectado, mesmo na fase de timócito I. Em timócitos corticais, o antígeno é intracitoplasmático e, subseqüentemente, torna-se de membrana. As únicas células que apresentam reatividade ao CD3, além das células T, são as células de Purkinje. Ele é expresso pela grande maioria das neoplasias de células T e completamente negativo em tumores originados de outras células, que o torna uma ferramenta específica. É importante lembrar que a marcação das neoplasias menos diferenciadas é citoplasmática, sendo melhor observada em esfregaços.

Os demais marcadores de célula T/NK são bastante mais sensíveis às condições de fixação do que aqueles já referidos. A gama de anticorpos disponíveis é muito mais ampla do que para os LNH-B, mas a maioria deles tem marcação pobre em tecidos fixados. Para a marcação dos LNH-T, os cortes de congelação são ainda muito utilizados. A seguir, realizamos a descrição dos principais anticorpos marcadores de antígenos de células T/NK.

O antígeno CD1a é pouco utilizado para estudar LNH-T, sendo mais útil em casos de histiocitose de células de Langerhans, onde há bons resultados. O antígeno CD1a é um polipeptídeo de 45kd associado à microglobulina-2- β . O antígeno é expresso por timócitos II, desaparecendo quando da diferenciação em célula T madura. A codificação do CD1 é feita no cromossomo 1 por pelo menos 5 genes, havendo a produção de no mínimo 3 polipeptídeos. O CD1a é o maior deles com 49kd, sendo os outros de 45kd (CD1b) e 43kd (CD1c). o anticorpo marca células de LLA-T, podendo ser negativo em neoplasias de células T mais diferenciadas, também identifica células interdigitantes e de Langerhans e suas neoplasias derivadas. É importante no reconhecimento de células interdigitantes em linfadenopatia dermatopática.

O antígeno CD2 está presente na superfície da maioria das células T circulantes. É uma molécula de 50kd e é o receptor (LFA-2) responsável pela agregação de hemácias de carneiro no teste clássico da formação de rosetas. O CD2 está aparentemente ligado à capacidade de proliferação dos linfócitos T e também na adesão celular pela associação com o CD58. O clone que dispomos é essencialmente igual ao OKT11 e não funciona em tecidos fixados e parafinados.

As células T auxiliares (helper/inducer) contêm um antígeno de aproximadamente 59kd e identificado como CD4. O antígeno CD4 serve como receptor para moléculas MHCII e para o vírus da imunodeficiência humana. O CD4 é encontrado em quase todos os timócitos, excluindo-se os timócitos medulares. É importante salientar que macrófagos podem expressar CD4. A relação de células CD4/CD8 é importante não apenas em casos de SIDA, mas também para se determinar se um infiltrado de células T é reacional ou neoplásico, como já visto na introdução desta seção. A maioria dos LNH-T são de células auxiliares como a micose fungóide, leucemia de células T do adulto e linfomas T periféricos. Problemas do uso deste anticorpo são a sua baixa diluição e difícil reprodutibilidade de resultados em tecidos fixados e incluídos em parafina.

Cerca de 95% das células T periféricas têm CD5 na sua superfície. É uma molécula de aproximadamente 67kd. O anticorpo é um marcador de células maduras que reage fracamente com timócitos corticais, sendo mais intensos nas células T periféricas e os timócitos medulares têm expressão intermediária. Uma das características do CD5 é a sua expressão também por neoplasias de células linfóides B como a leucemia linfocítica crônica, linfomas linfocíticos e, principalmente, em linfomas de células do manto. Em outras neoplasias como a tricoleucemia (*hairy cell leukemia*), os linfomas foliculares e linfomas B de alto grau ele não é expresso. Seu uso dentro de um painel de anticorpos é muito útil, especialmente naquelas neoplasias de maior diferenciação. O anticorpo não é de fácil manuseio em tecidos pré-fixados, embora estejam sendo desenvolvidos, mais recentemente, clones mais confiáveis para utilização em tecidos rotineiramente processados. No entanto, é excelente em tecidos congelados,

O antígeno CD7 é uma molécula de 40kd presente na maioria das células T, independentemente do seu grau de maturação. É talvez o pan-T de mais amplo espectro. Desta forma, neoplasias de células T, desde leucemias linfoblásticas até linfoma T periféricos, são marcadas. O uso do anticorpo monoclonal é restrito pela pouca resistência do antígeno à fixação.

O CD8 é o antígeno que caracteriza as células T supressoras/citotóxicas. É uma molécula de 32kd e serve como receptor para moléculas do MHC de classe I. Sua porção citoplasmática participa do sistema p56/tirosina-cinase regulando a função do complexo CD3/TCR. O anticorpo anti-CD8 marca 15-20% das células T das áreas interfoliculares dos linfonodos, mas cerca de 80% das células T da medula óssea e intestino são CD8 positivas. No baço, as células dos sinusóides são positivas. O anticorpo funciona bem em tecidos fixados.

A atividade citotóxica pode ser demonstrada com o uso de TIA-1 (T-cell restricted intracellular antigen), granzima A e B e perforina ⁽²⁾. Estes marcadores identificam sub-sets de linfócitos T citotóxicos e células *natural-killer*. A utilização destes anticorpos é específica e limitada, uma vez que os LNH-T de células citotóxicas ou NK são minoria. TIA-1 é uma proteína de 15kD, estruturalmente relacionada com a família do fator de necrose tumoral, que leva a células alvo à apoptose ⁽²⁾. O anticorpo que reconhece esta proteína é altamente específico, identificando células CD8 positivas não-estimuladas, funciona em tecidos parafinados e pode ser obtido comercialmente. Granzimas A/B e perforina são características de células NK (CD3-, CD16+) e células T $\gamma\delta$, mas células CD8+ não-estimuladas não as expressam. Todavia, quando linfócitos CD8+ são estimulados, estas moléculas passam a ser expressas. Portanto, granzima e perforina são marcadores de células ativadas ⁽³⁾.

O Tdt é um marcador de utilidade limitada e de difícil manuseio. Ele é mais útil em biópsias de medula óssea. É uma polimerase do DNA e é necessário lembrar que ela não é específica de precursores linfóides T, mas também as células precursoras B a expressam. Sua positividade é diagnóstica de linfomas linfoblásticos (ou leucemias agudas) ou de crises blásticas em leucemias crônicas. Os anticorpos policlonais são de mais fácil manuseio.

Há outros antígenos que são úteis na marcação de LNH-T, sem serem marcadores de linfócitos T. destes os mais importantes são o CD30, o NPM/ALK e aqueles marcadores de proliferação celular. O CD30 é um antígeno glicoprotéico de 105 a 120kd que é expresso tanto por linfócitos B, como T, além de células de Reed-Sternberg. É um marcador associado a ativação celular, e pertence à família de receptores para fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento neural (NGF).⁽⁴⁾ Não é completamente

específico para células linfóides, pois carcinomas embrionários podem expressar este antígeno. Seus principais anticorpos são o Ki-1 (material não fixado) e o Ber-H2 (material fixado).

Cabe aqui comentar sobre a proteína quimérica p80. Trata-se do produto da translocação não randômica t(2;5) (p23;q35) resultante na fusão do gene da nucleofosmina (NPM), localizada no cromossomo 5q35 ao gene da cinase do linfoma anaplásico (ALK), localizado no cromossomo 2p23⁽⁵⁻⁸⁾. Postula-se que a produção e conseqüente ativação da proteína resultante (p80^{NPM/ALK}) esteja associada à patogênese do linfoma anaplásico de grandes células, pois está presente em cerca de 65% dos casos^(7, 9-12). Um anticorpo policlonal⁽⁸⁾ e outro monoclonal, denominado ALK1⁽¹³⁾ reconhecem esta proteína com alto grau de sensibilidade e especificidade, dando um padrão de positividade tanto nuclear, quanto citoplasmática em aproximadamente 20% das células em um determinado corte histológico quando o antígeno está presente.

Os marcadores de proliferação celular, Ki-67 ou PCNA, são também muito utilizados em LNH-T, mas são comentados em outro capítulo.

Tabela 1 - Lista dos linfomas não-Hodgkin de células T/NK segundo a classificação REAL (Harris et. al., 1997)

- | |
|--|
| <p>I. Neoplasia de Precusores de Células T</p> <p>1. Leucemia/linfoma linfoblástico</p> <p>II. Neoplasias de Células T ou NK Periféricas</p> <p>1. Leucemia linfocítica/prólinfocítica crônica</p> <p>2. Leucemia de linfócitos grandes e granulares, tipo de células T ou tipo de Células NK</p> <p>3. Micose fungóide/síndrome de Sèzary</p> <p>4. Linfomas T periféricos não-especificados</p> <p><i>Categorias citológicas provisórias:</i> células médias, células grandes, misto, linfoepitelióide.</p> <p><i>Subtipo provisório:</i> linfoma hepatoesplênico de células T $\gamma\delta$</p> <p><i>Subtipo provisório:</i> linfoma paniculítico sub-cutâneo</p> <p>5. Linfoma T associado à linfadenopatia angioimunoblástica</p> <p>6. Linfoma angiocêntrico</p> <p>7. Linfoma intestinal de células T (+/- associado a enteropatia)</p> <p>8. Linfoma/leucemia de células T do adulto</p> <p>9. Linfoma anaplásico de grandes células CD30+, tipo de células T ou <i>Null-cell</i></p> <p>10. Linfoma Anaplásico de Grandes Células, similar a Hodgkin's (entidade provisória)</p> |
|--|

PRINCIPAIS LINFOMAS T E SUA MARCAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA

Alguns LNH-T têm características especiais que merecem comentários. Não é objetivo descrever todas as características clínico-patológicas destes tumores, mas sim enfatizar suas particularidades imuno-histoquímicas.

Leucemia Aguda/ Linfoma Linfoblástico T

LNH-T de células precursoras são chamados linfomas linfoblásticos e são caracterizados pelo aspecto indiferenciado do núcleo, com cromatina fina e homogênea, nucléolo pequeno e citoplasma escasso. O quadro histológico é monótono, com mitoses freqüentes e indistinguível dos linfomas linfoblásticos B. A grande maioria deles (cerca de 90%) tem imunofenótipo imaturo, imitando as células T do timo cortical. Esta imaturidade é caracterizada pela positividade nuclear para Tdt e co-expressão de CD4 e CD8. A expressão de CD10 (CALLA) pode ocorrer em alguns deles, especialmente nos mais imaturos. A não-expressão de Tdt não muda o diagnóstico, pois pode ocorrer por aspectos técnicos, mas alguns destes linfomas realmente não expressam a enzima e sim um fenótipo T totalmente anômalo (CD7+, CD1-, CD4-, CD8-, CD5-). A ocorrência de leucemia linfóide aguda concomitante é muito comum. Raramente os LNH-T linfoblásticos podem expressar marcadores de células NK (CD16+, CD7+), e geralmente são neoplasias muito agressivas. Cuidado especial deve ser tomado com as lesões do mediastino, com o diagnóstico diferencial de timoma linfocítico e nesta situação uma coloração para citoqueratina é muito útil.

Linfomas T periféricos (LNH-TP)

LNH-TP constituem um grupo heterogêneo de neoplasias e caracterizam-se imunofenotipicamente pela expressão de marcadores próprios das células T maduras. Quase que invariavelmente têm expressão anômala de antígenos, como já comentado neste texto. É fato conhecido dos patologistas que alguns aspectos como polimorfismo celular, rede vascular proeminente, presença de células pleomórficas, citoplasma mais abundante e necrose, são dados que levam à suspeita de LNH-TP. Mas nenhum destes dados é definitivo e a imunofenotipagem é fundamental para a confirmação. Há muitos tipos de LNH-TP conforme pode ser atestado na lista REAL (Tabela 1). Alguns deles merecem comentário especial.

A **micose fungóide** é um linfoma T cutâneo com características histológicas variadas, incluindo a invasão epidérmica por células T maduras, com expressão antigênica aberrante, formando os microabscessos de Pautrier. Outra característica destes microabscessos é que há igualmente células dendríticas reticulares e células de Langerhans, que são positivas para proteína S-100 e CD1a, sugerindo que estas células apresentadoras de antígenos têm participação na patogênese da micose fungóide. As células T neoplásicas apresentam padrão de expressão aberrante de antígenos, e o exame imuno-histoquímico é fundamental no diagnóstico. Estas células não expressam CD7 ou CD8. Portanto, micose fungóide é uma neoplasia de linfócitos maduros que expressam fenótipo de célula T auxiliar, embora casos isolados de neoplasias de células citotóxicas sejam descritos, geralmente associadas com comportamento agressivo. Nas fases tumorais da doença é comum o aparecimento de células grandes CD15+, levando à hipótese da relação patogênica entre a micose fungóide e a doença de Hodgkin.

O **linfoma linfoepitelióide**, ou linfoma de Lennert, é um LNH-TP raro, geralmente de pacientes idosos, composto por células T de imunofenótipo maduro, pequenas e

médias, e agregados de macrófagos epitelióides ⁽¹⁴⁾. Na lista REAL, ele é considerado uma variante dos LNH-TP e muito se debate se o quadro histológico caracteriza uma entidade ou é apenas uma manifestação morfológica. A imuno-histoquímica é muito importante nestes casos para caracterizar um LNH-TP, pois linfomas B e doença de Hodgkin podem ter apresentações ricas em histiócitos epitelióides, tornando o diagnóstico diferencial histológico difícil.

O **linfoma anaplásico de grandes células CD30+** é considerado um LNH-TP, embora casos de expressão nula ou de células B sejam encontrados ocasionalmente. Foi descrito no final da década de 1980 como uma entidade clínico-patológica, tendo como base, primariamente, a reatividade das células neoplásicas (grandes e anaplásicas) para o anticorpo CD30/Ki-1 e foi amplamente reconhecido como linfoma Ki-1. Outras características que, associadas ao quadro morfológico, podem levar a enganos diagnósticos com carcinoma, são a positividade para EMA e a falta de expressão de CD45 (em cerca da metade dos casos). As células anaplásicas geralmente expressam CD2 e CD4 e o painel de marcadores T+, CD30+, EMA+, CD15- é praticamente diagnóstico, sempre respeitado o aspecto morfológico. Na década de 1990 este conceito ficou menos claro, pois foram descritos casos não anaplásicos e, pior, casos sem expressão da proteína CD30. Além disso, sempre foi muito discutido na literatura especializada se esta entidade e o linfoma de Hodgkin constituem um espectro, pois é fato que há sobreposição de características tanto morfológicas quanto imuno-histoquímicas entre eles ⁽¹⁵⁾. Uma quantidade relativamente grande de formas variantes morfológicas do LAGC são descritas ^(7, 16-20). Entre elas o monomórfico, o sarcomatóide ⁽²¹⁾, o "rico em células gigantes", o Hodgkin-símile, o linfo-histiocítico, o associado à infecção pelo HIV e o de pequenas células ⁽²²⁾. O significado biológico destas apresentações morfológicas ainda está por ser determinado. Do ponto de vista de apresentação clínica, também ficou claro que há pelo menos três tipos de apresentação, isto é, o LAGC primário nodal, o LAGC primário cutâneo e o secundário (como evolução da micose fungóide, linfomas T periféricos e linfoma de Hodgkin).

A identificação de uma alteração cromossômica característica do LAGC, i.e., t(2;5) e a proteína resultante, p80, discutidas em seção anterior deste capítulo, veio trazer, aparentemente uma luz a este problema. Aproximadamente 65% dos casos de LAGC contêm este tipo de alteração, como verificado, tanto por métodos de biologia molecular, quanto imuno-histoquímicos ^(7,11,23). Ainda, estes casos reconhecidos pela positividade para proteína p80, apresentam relativa homogeneidade, tanto na apresentação clínica, quanto no quadro histológico. Ou seja, acometem pacientes na infância ou adolescência e apresentam bom prognóstico, com sobrevida de 5 anos de 72%, contra 30% do grupo p80- ^(7,24). As células apresentam núcleo arredondado ou oval com cromatina regular e nucléolos múltiplos, alongados ou irregulares, mas não muito proeminente, características semelhantes àquelas descritas classicamente. Além da positividade para p80, mostram imunofenótipo T ou "null", são CD30+, EMA+ e CD15-.

LAGCs p80- são menos homogêneos e Nakamura *et al.* ⁽⁷⁾ subdividiram-nos em 5 categorias: LAGC linfoma de Hodgkin-símile, LAGC comum, LAGC cutâneo, LAGC secundário e LAGC clássico p80-. Estes autores verificaram, utilizando detecção da proteína p80 por técnica imuno-histoquímica, que, embora intermediários aparentemente os LAGC p80- linfoma de Hodgkin-símile parecem estar mais próximos ao linfoma de Hodgkin do que ao LAGC clássico. A categoria denominada LAGC clássico p80- representou 0,03% da casuística desses autores e, além do quadro morfológico semelhante ao LAGC clássico, apresentou positividade para EMA. Tal fato pode ter explicação na não expressão fenotípica da translocação t(2;5)

Os **linfomas T intestinais** são neoplasias com quadro clínico característico. Eram anteriormente conhecidos como *histiocitose maligna do intestino* ^(25,26). São pacientes com história crônica de doença celíaca, mas nem todos os autores relatam tal evolução ⁽²⁷⁾. O intestino exibe ulcerações e, muitas vezes, a primeira manifestação é decorrente da perfuração intestinal. Acredita-se que tenham origem em linfócitos T com TCR γ/δ e são CD4 e CD8 negativos. Expressam CD3, mas o melhor marcador, em nossa experiência é o CD43, sendo que o CD45RO é algumas vezes somente fracamente positivo ou mesmo negativo. É comum a expressão de marcadores de grânulos citotóxicos ⁽³⁾.

Linfomas de Células Natural-Killer (LNH-NK)

Se conhecemos relativamente menos acerca dos LNH-T quando comparamos com os linfomas B, isto é ainda mais patente em relação às neoplasias NK. Estas neoplasias são raras e dispomos de apenas 3 marcadores para caracterizá-las.

O primeiro deles é um marcador de células mielomonocíticas e de células NK, o CD16. É uma glicoproteína de 50 a 65kd e expressa por células NK não-ativadas. É importante lembrar que macrófagos, neutrófilos e algumas células T também expressam este antígeno. Ele é pouco útil em histopatologia, mas é bastante usado em citometria de fluxo.

Um marcador mais útil é o CD56, cujos clones de anticorpos que o reconhecem são o Leu-19 e NKH1. É uma molécula de 140kd que é uma isoforma de uma integrina, o N-CAM. O CD56 é expresso por células NK ativadas e em repouso, e algumas células CD8+ co-expressam-no. É o marcador mais útil para os casos de linfomas angiocêntricos. Linfomas angiocêntricos são doenças geralmente necrosantes e sempre causam problemas diagnósticos. Como geralmente as biópsias são diminutas, a marcação pelo CD45RO é muitas vezes dúbia, mas sempre expressam CD56.

O terceiro marcador utilizado para células NK é o CD57. A molécula é um hidrato de carbono e é expresso por células T e cerca de metade das células NK. Oligodendrogliomas, carcinomas indiferenciados de pequenas células do pulmão e outros tumores neuroectodérmicos também expressam CD57. O clone mais utilizado é o Leu-7.

Marcadores de atividade citotóxica podem ser utilizados para a marcação destes linfomas, sempre lembrando que não são diagnósticos, pois linfomas de células CD8 também os expressam ⁽²⁸⁾.

O conhecimento acerca de LNH-NK é ainda muito recente, com poucas séries publicadas. Sabemos que são neoplasias agressivas, com freqüente leucemização e doença sistêmica ⁽²⁹⁾. Os mais conhecidos são os linfomas nasais, anteriormente conhecidos como granulomas letais da linha média. Esta apresentação é tão marcante que faz com que os LNH-NK sejam divididos em tipos nasal ⁽³⁰⁾ e não-nasal ⁽³¹⁾. O tipo não-nasal frequentemente acomete a pele ⁽³²⁾.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harris NL, Jaffe ES, Stein H. et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84:1361-1392.
2. Felgar RE, Macon WR, Kinney MC, Roberts S, Pasha T, Salhany KE. TIA-1 expression in lymphoid neoplasms. Identification of subsets with cytotoxic T lymphocyte or Natural killer cell differentiation. *Am. J. Pathol.* 1997; 150:1893-1900.
3. De Bruin PC, Connolly CE, Oudejans JJ, Kummer JÁ, Jansen W, McCarthy CF, Meijer CJLM. Enteropathy-associated T-cell lymphomas have a cytotoxic T-cell phenotype. *Histopathol.* 1997; 31:313-317.
4. Miettinen M. CD 30 distribution: immunohistochemistry study on formaldehyde-fixed, paraffin-embedded Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1992; 11:1197-201.
5. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB. Fusion of a kinase gene, ALK, to a molecular protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-1284.
6. Kasai K, Kon S, Kikuchi K, Sato Y, Kameya T. Expression of carbohydrate antigens, p80^{NPM/ALK}, cytotoxic cell-associated antigens, and Epstein-Varr virus gene products in anaplastic large cell lymphomas. *Pathol. Int.* 1998;48:171-178.
7. Nakamura S, Shiota M, Nakagawa A, Yatabe Y, Kojima M, Motoori T, Suzuki R, Kagami Y, Ogura M, Morishima Y, Mizoguchi Y, Okamoto M, Seto M, Koshikawa T, Mori S, Suchi T. Anaplastic large cell lymphoma: a distinct molecular pathologic entity. A reappraisal with special reference to p80^{NPM/ALK} expression. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997;21:1420-1432.
8. Shiota M, Fujimoto J, Takenaga M. Diagnosis of t(2;5) (p23;q35)-associated Ki-1 lymphoma with immunohistochemistry. *Blood* 1994; 83:3648-3652.
9. ElMBERGER G, Lozano MD, Weisenburger DD, Sanger W, Chan WC. Transcripts of the npm-alk fusion gene in anaplastic large cell lymphoma, Hodgkin's disease, and reactive lymphoid lesions. *Blood* 1995;86:3517-3521.
10. Herbst H, Anagnostopoulos F, Heinze B, Kurkop H, Nummel M, Stein H. ALK gene products in anaplastic large cell lymphomas and. *Blood* 1995;86:1694-1700.
11. Sellmann A, Otsuki T, Vogelbruch M, Clark HM, Jaffe ES. Analysis of the t(2;5) (p23;q35) translocation by reverse transcription-polymerase chain reaction in CD 30+ anaplastic large cell lymphomas, in other non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype, and in Hodgkin's disease. *Blood* 1995;86:2321-2328.
12. Weisenburger DD, Gordon BG, Vose JM. Occurrence of the t(2;5) (p23;q35) in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996;87:3860-3868.
13. Pulford K, Lamant L, Morris SW. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM) – ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997;89:1394-1404.
14. Patsouris E, Engekhard M, Zwingers T, Lennert K. Lymphoepithelioid cell lymphoma (Lennert's lymphoma): clinical features derived from analysis of 108 cases. *Br. J. Haematol.* 1993; 64:346-348.
15. Leoncini L, Del Vecchio MT, Kraft R. Hodgkin's disease and CD30-positive anaplastic large cell lymphomas: continuous spectrum of malignant disorders. *Am. J. Surg. Pathol.* 1990;14:1047-1057.
16. Kadin ME. Primary Ki-1 positive anaplastic large cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity. *Ann. Oncol.* 1994;5(suppl 1): 25-30.
17. Penny FJ, Blaustein JC, Longtine JA, Pinkus GS. Ki-1 positive large cell lymphoma, a heterogeneous group of neoplasms. Morphologic, immunophenotypic, genotypic and clinical features of 24 cases. *Cancer* 1991;68:362-373.
18. Pileri S, Bocchia M, Baroni CD. Anaplastic large cell lymphoma (Ki-1+/CD30+): results of a retrospective clinicopathologic study of 69 cases. *Br. J. Haematol.* 1994;86:513-523.
19. Stein H. Ki-1 anaplastic large cell lymphoma: is it a discrete entity? *Leuk Lymph* 1993;10 (suppl):81-84.
20. Zinzani PL, Bendandi M, Martelli M. Anaplastic large-cell lymphoma: clinical and prognostic evaluation of 90 adult patients. *J. Clin. Oncol.* 1996;14:955-962.

21. Chan JKC, Buchanan R, Fletcher CDM. Sarcomatoid variant of anaplastic large cell Ki-1 lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1990;14:983-988.
22. Kinney MC, Collins RD, Greer JP, Whitlock JA, Sioutos N, Kadin ME. A small cell variant or primary Ki-1 (CD30)+ T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993;17: 859-868.
23. Kinney MC, Greer JP, Kadin ME, Decoteau JF, Collins RD. p80^{NPM/ALK} expression in Ki-1+ lymphomas: histologic and immunophenotypic correlation. *Lab. Invest.* 1996;74:114.
24. Greer JP, Flexner JM, Kallianpur AR. Ki-1+ Anaplastic large cell lymphoma (ALCL): correlation of clinical features with p80^{NPM/ALK} expression and histology. *Blood* 1996;88:224.
25. Mathus-Vliegen E.M.H., Van Halteren H., Tytgat G.N.J. Malignant lymphoma in coeliac disease: various manifestations with distinct symptomatology and prognosis. *J. Intern. Med.* 1994; 236:43-49.
26. Murray A, Cuevas E.C., Jones D.B., Wright D.H. Study of the immunohistochemistry and T-cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 1995; 146:509-519.
27. Ferguson A, Kingstone K. Coeliac disease and malignancies. *Acta Paediatr.* 1996; 412(Suppl):78-81.
28. Ohshima K, Suzumiya J, Shimazaki K, Kato A, Tanaka T, Kanda M, Kikuchi M. Nasal/NK cell lymphomas commonly express perforin and Fas ligand: important mediators of tissue damage. *Histopathol.* 1997; 31:444-450.
29. Kwong Y.L., Chang ACL, Liang R, Chiang AKS, Chim CS, Chan TK. CD56+ NK lymphomas: clinicopathological features and prognosis. *Br. J. Haematol.* 1997; 97:821-829.
30. Chiang AKS, Chan SCL, Srivastava G, Ho FCS. Nasal T/NK cell lymphomas are derived from Epstein-Barr virus-infected cytotoxic lymphocytes of both NK- and T-cell lineage. *Int. J. Cancer* 1997; 73:332-338.
31. Chan JKC, Sin VC, Wong CS, NG CS, Tsabing WYW, Chan CH, Cheung MMC, Lau WH. Nonnasal lymphoma expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood* 1997; 89:4501-4513.
32. Savoia P, Fierro MT, Novelli M, Quaglino P, Verrone A, Geuna M, Bernengo MG. CD56-positive cutaneous lymphoma: a poorly recognized entity in the spectrum of primary cutaneous disease. *Br. J. Dermatol.* 1997; 137:966-971.

14. LINFOMA DE HODGKIN

Roberto A. Pinto Paes e José Cabeçadas

INTRODUÇÃO

A doença de Hodgkin (DH) ou linfoma de Hodgkin é uma neoplasia de origem linfóide caracterizada por composição de células atípicas, cujo representante principal é a célula de Reed-Sternberg (RS), imersa em característico substrato de aspecto inflamatório. No início, começa em um linfonodo ou cadeia de linfonodos, com posterior propagação para outros grupos de linfonodos por contiguidade ou mesmo para outros órgãos.

Foi descrita em 1832 por Thomas Hodgkin, cirurgião inglês, que relatou observação de sete doentes com características clínicas incomuns envolvendo linfonodos e que apresentavam quadro clínico e histológico peculiar.

A principal característica desta doença é a célula descrita em 1898 por Sternberg e posteriormente, em 1902, por Dorothy Reed, desde então batizada com o nome de célula de Reed-Sternberg. Posteriormente foram descritas variantes destas células, às quais foi dado o nome genérico de células de Hodgkin.

Originalmente acreditava-se que a doença de Hodgkin era processo inflamatório granulomatoso pelo quadro clínico manifestado e, sobretudo, pelo aspecto histológico. Como resultado do avanço no conhecimento da biologia desta doença e das neoplasias de um modo geral, tornou-se claro que ela seja, verdadeiramente, uma neoplasia ou, mais precisamente, um linfoma. Entretanto, é classificada de modo diferente dos chamados linfomas não Hodgkin, em virtude das diferenças morfológicas e do comportamento clínico. Com efeito, embora a DH seja atualmente considerada biologicamente heterogênea é, se excetuarmos o predomínio linfocitário nodular, estranhamente homogênea, tanto em termos de diagnóstico clínico, como quanto à resposta à terapêutica.

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

O diagnóstico da DH é estabelecido, na grande maioria das vezes, através do exame anatomopatológico. O diagnóstico histológico é estabelecido pelo encontro da célula diagnóstica, de RS ou suas variantes, em meio a substrato celular característico. No entanto, células semelhantes a estas têm sido descritas em casos de pacientes com infecção viral, linfadenites reacionais e linfomas não Hodgkin. Torna-se, portanto, essencial a interpretação do quadro histológico como um todo: célula RS, substrato celular reacional e alterações do estroma.

A célula RS é grande, binucleada ou multinucleada, com núcleos lobulados, nucléolos proeminentes e eosinofílico, semelhante a inclusão, freqüentemente com halos perinucleolares, com citoplasma amplo.

Outras variantes são reconhecidas, principalmente a forma binucleada, que lembra "olho de coruja" ou "mirror-cell", e a variante lacunar. Outras formas podem ser úteis para a classificação dos subtipos histológicos ou para o diagnóstico de comprometimento extranodal, mas não são suficientes para estabelecer o diagnóstico primário. Estas seriam as variantes mononucleares, freqüentemente chamadas células de Hodgkin, células

mumificadas (apoptóticas) e outras formas gigantes multinucleares.

Outra variante, conhecida como célula L&H, é uma célula de grande volume, com morfologia peculiar, apresentando núcleo grande e claro, irregular e multilobado, semelhante a um grão de pipoca ("pop-corn cell"). Esta célula apresenta características imunológicas diferentes da célula RS clássica, é importante no diagnóstico da forma predominância linfocítica, e será discutida posteriormente.

Entre as células reativas do substrato, destacam-se os linfócitos pequenos, algumas vezes associados com plasmácitos, eosinófilos e, menos freqüentemente, neutrófilos. Histiócitos estão presentes em número variável, às vezes com citoplasma espumoso, com caracteres de xantogranulomas ou às vezes assumindo arranjo epitelióide. Proliferação de fibroblastos e colágeno é comum e a caracterização histológica do tipo de fibrose é importante na classificação da DH.

ORIGEM DA CÉLULA RS

A origem da célula RS tem sido controversa na hematopatologia. Várias hipóteses têm sido aventadas, quase todas com argumentos bem fundamentados. Já foram consideradas derivadas de linfócitos, monócitos, histiócitos, células reticulares. Atualmente, a maioria aceita que se trate de fato de linfócitos ativados. Pelo menos na forma de predominância linfocítica o fenótipo B é facilmente comprovado, enquanto nas outras formas dificilmente se comprovam características de linfócitos B.

A associação da DH com outros linfomas, particularmente com leucemia linfocítica crônica, linfomas B de grandes células, e até mesmo composição entre estes, falam a favor da origem linfóide destas células. Mais raramente, há referências que associam DH a neoplasias de células T.

Estudos sorológicos e epidemiológicos realizados na década de 70 chamaram atenção para associação possível entre DH e o vírus Epstein-Barr (EBV). A primeira descrição da presença do EBV na célula de Reed-Sternberg foi feita por Weiss e colaboradores em 1989 ⁽¹⁾, demonstrada por técnica de hibridização "in situ". Entretanto, utilizando-se técnicas imuno-histoquímicas, demonstra-se com relativa facilidade a presença do EBV em células neoplásicas do linfoma de Hodgkin, pela identificação dos genes virais LMP 1 e 2, na célula RS, com frequência variável, sendo mais comum em crianças e jovens. Este procedimento pode ser útil no diagnóstico diferencial da DH com outras entidades.

CLASSIFICAÇÃO

Considerando tratar-se de doença de células com histogênese incerta é, no mínimo, curioso que os atuais esquemas de classificação sejam amplamente aceitos, distanciando-se tanto das controvérsias para as inúmeras classificações já apresentadas para os linfomas não Hodgkin. Isto se deve, talvez, à alta correlação entre tipos histológicos quase sempre bem padronizados e a correspondente evolução clínica.

A primeira classificação da DH mundialmente aceita deve-se a Jackson e Parker, em 1947, correlacionando os caracteres histológicos com o prognóstico ⁽²⁾. Estabeleceram as seguintes formas: paraganuloma, de bom prognóstico, granuloma e forma sarcomatosa, de mau prognóstico. Lukes, em 1963, propõe uma nova classificação, posteriormente modificada em Rye, em 1965 (Tabela 1) ^[3-5].

A atual classificação da DH, proposta pelo sistema classificatório da R.E.A.L., é semelhante à de Rye, com algumas modificações e acréscimos. A forma predominância linfocítica é considerada entidade distinta dos outros tipos da doença, chamados de DH clássica (esclerose nodular, celularidade mista e, depleção linfocítica). Foram ainda propostas duas outras entidades provisórias: DH clássica, rica em linfócitos e linfoma anaplásico de grandes células, tipo Hodgkin⁽⁶⁾. Esta classificação foi recentemente modificada pela comissão da Organização Mundial da Saúde responsável pela nova classificação de doenças neoplásicas dos tecidos linfóide e hematopoiético. (Tabela 2).

Tabela 1- Doença de Hodgkin: classificações			
Jakson & Parker (1944)	Lukes (1963)	Rye (1965)	REAL (1994)
Paragranuloma	L&H nodular L&H difuso	Predominância Linfocítica (PL)	PL
Granuloma	Esclerose Nodular Celularidade Mista Fibrose Difusa	EN CM	EM CM
Sarcoma	Reticular	Depleção Linfocítica (DL)	DL

REAL: Entidades provisórias: DH clássica rica em linfócitos.

Linfoma anaplásico de grandes células tipo Hodgkin

Tabela 2 - Linfoma de Hodgkin, classificação da O.M.S. (Dezembro, 1997)	
Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular	
Linfoma de Hodgkin , clássico	Linfoma de Hodgkin, esclerose nodular (graus I e II)
	Linfoma de Hodgkin clássico, rico em linfócitos
	Linfoma de Hodgkin, celularidade mista
	Linfoma de Hodgkin, depleção linfocítica

IMUNOFENÓTIPO

O imunofenótipo das células atípicas da DH depende do subtipo histológico e, de um modo geral, o mais comum é o que se vê na tabela 3.

Tabela3 - Doença de Hodgkin – imunofenótipo

Marcador antigênico	DH - PL célula L&H	DH – clássica células R-S e variantes
CD 15 (Leu - M1)	negativo	positivo
CD 30 (Ber - H2)	negativo	positivo
CD 45 (LCA)	positivo	negativo
CD 20 (L 26)	positivo	negativo
EMA	positivo	negativo
EBV	negativo	positivo
Células T CD57+	positivo	negativo

Algumas particularidades devem ser observadas em cada um dos subtipos histológicos:

Imunofenótipo da doença de Hodgkin subtipo predominância linfocítica

As variantes L&H da célula de Reed-Sternberg são caracteristicamente positivas para marcadores de linfócitos B, padrão de membrana (CD19, CD20, CD74, Cdw75), são positivas para antígeno leucocitário comum (LCA/CD45) e contêm cadeia J citoplasmática (proteína associada à síntese de imunoglobulina). Frequentemente são também positivas para antígeno de membrana epitelial (EMA) ^[7-14].

Os marcadores padrões da célula RS nas formas clássicas, CD 15 e CD 30, são negativos para a célula L&H. O bcl-2 é igualmente negativo.

O substrato celular linfocítico em torno das células L e H, especialmente constituindo os nódulos da forma nodular são linfócitos B e T policlonais.

O imunofenótipo dos linfócitos B é semelhante ao dos linfócitos da zona do manto (CD20+, KIB3+, IgM+, IgD+) ^[15].

O imunofenótipo dos linfócitos T, especialmente os que formam rosetas em torno da célula L e H é idêntico aos dos linfócitos T dos centros germinativos dos folículos secundários (CD2+, CD3+, TCR $\alpha\beta$ +, CD4+, CD8-, CD45RO+, CD57+, CD69+).

Estas células são também positivas para proteínas nucleares associadas a proliferação celular como Ki-67 e PCNA, indicando que estão em ciclo de multiplicação.

Imunofenótipo da doença de Hodgkin - formas clássicas (EN, CM, DL)

As células de Reed-Sternberg e suas variantes nas formas clássicas da doença de Hodgkin têm imunofenótipo característico: CD15+, CD30+, CD45- ⁽⁶⁾.

Entretanto, células atípicas com este imunofenótipo faz o diagnóstico da DH apenas nos casos onde o quadro histológico tem caracteres desta entidade. Por outro lado, DH com quadro histológico típico pode apresentar alterações do imunofenótipo, principalmente quanto ao CD15, na maioria das vezes por motivos de ordem técnica na recuperação antigênica. A fixação pelo formol favorece alta incidência de falsos negativos, o que pode ser significativamente reduzido com o uso de recuperação de epítomos pelo calor. Alguns autores advogam, também, a utilização como anticorpo secundário dum anticorpo anti μ visto que, ao contrário da maioria dos outros monoclonais, o Leu M1 é uma IgM ⁽¹⁶⁾.

A expressão do CD15 pela célula RS é observada em cerca de 85% dos casos de DH clássicos, com padrão de reação característico paranuclear, tipo Golgi, embora possa ser observada também coloração de membrana ou citoplasmática difusa. Para alguns autores a ausência de expressão de CD15 em casos de DH pode ser considerada como fator prognóstico negativo para recidiva da doença e sobrevivência⁽¹⁷⁾.

A expressão de CD30 pelas células RS é positiva em mais de 90% da DH clássica. O padrão de reatividade é igualmente paranuclear e de membrana.

Deve-se fazer observar que a expressão de CD15 e CD30 não faz isoladamente o diagnóstico de DH pois, 4% dos linfomas B e 20% dos linfomas T também podem expressar CD15⁽¹⁸⁾. Alguns carcinomas, histiócitos reacionais e células infectadas por CMV também podem expressar este antígeno. Os linfomas anaplásicos de grandes células são caracteristicamente CD30 positivos. Este antígeno pode ainda ser demonstrado em outros linfomas (usualmente em células isoladas), histiócitos, plasmócitos, alguns carcinomas e tumores de células germinativas.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Há 4 áreas principais relativamente ao diagnóstico diferencial da DH.

1. Linfadenite - gânglio reativo / DH

Algumas linfadenites, especialmente virais, podem conter células multinucleadas de tipo RS e sugerir a hipótese de DH. A atenção ao tipo celular de fundo, com blastos de tamanho variável deve excluir a DH. Também podem ser observadas células multinucleadas em gânglios reativos, especialmente no sarampo, que poderão ser confundidas com células "pop-corn". O estudo cuidadoso do contexto de células acompanhantes é, mais uma vez, fundamental na identificação do processo de base.

A transformação progressiva dos centros germinativos (TPCG) pode estar associada à DH e causar um problema. As características arquiteturais e citológicas são extremamente importantes. No entanto, a imuno-histoquímica pode ser um adjuvante útil. Os centros germinativos progressivamente transformados são geralmente redondos, bem delimitados e espaçados, com folículos típicos entre si. Ao contrário, os folículos da DH-PL são adjacentes moldando-se uns aos outros. Podem ser mal definidos, fundindo-se em áreas difusas. Em grande ampliação os folículos da transformação progressiva contêm linfócitos pequenos, centrocitos e centroblastos. As células "pop-corn" não são identificáveis. Há, no entanto, alguns centroblastos que podem ter características sobreponíveis com as células "pop-corn". Ocorrem usualmente isolados e não em agregados como as células do PL.

A imuno-histoquímica é apenas útil na identificação de células T agrupadas, comuns no PL, ao invés dos centros transformados em que o padrão é semelhante ao observado nos centros germinativos reativos. Também se identificam células T formando rosetas com blastos B, o que não ocorre na TPCG.

2. DH clássica / PL nodular

Nos casos típicos o padrão nodular e as células "pop-corn" fazem o diagnóstico. Se aceitarmos a entidade DH rica em linfócitos a existência numa forma nodular pode causar sérios problemas. Os critérios morfológicos são pouco fiáveis e o recurso à imuno-histoquímica é indispensável. As células RS são o elemento chave: na variante rica em

linfócitos elas têm fenótipo clássico e no PL são CD15-, CD30- (Tabela 3).

Proliferações difusas com células CD20+, EMA+ podem corresponder a linfomas B ricos em células T (seção seguinte).

3. DH Clássica / Linfoma B rico em células T ou histiócitos

O linfoma B rico em células T ou em histiócitos (LBRCT/H) é um linfoma difuso com um fundo de linfócitos, agregados de histiócitos epitelióides e abundantes células mononucleares sugerindo tanto o PL como a forma clássica da DH ⁽¹⁹⁻²²⁾. Os blastos podem assemelhar-se a células "pop-corn", imunoblastos, centroblastos ou a combinações dos três. O diagnóstico de LBRCT/H deve ser considerado sempre que se suspeitar de DH-PL difusa ou em qualquer DH clássica sem eosinófilos ou com mais células grandes que o habitual. Áreas nodulares favorecem PL e células binucleares típicas favorecem a forma clássica.

A análise do fenótipo das células grandes é pouco útil por ser semelhante ao do PL; contudo, a presença de imunoglobulina de superfície facilmente detectável, sugere o diagnóstico de LNH. Também a marcação com CD20 pode revelar um padrão nodular e um fundo rico em células B que favorecem o diagnóstico de DH-PL. Agregados foliculares de células foliculares dendríticas (CD21+) e abundantes células CD57+ são também a favor de DH-PL ⁽²³⁾. A distinção com a forma clássica da DH é possível com imuno-histoquímica, baseando-se essencialmente na reatividade com os anticorpos anti CD20, CD15 e CD30. Com efeito, se as células grandes forem CD20+, CD15-, CD30- trata-se, provavelmente, de um LBRCT/H. Embora algumas células do LBRCT/H possam exprimir CD30, a presença de abundantes células CD15, CD30, ou ambos, favorece DH.

4. DH / LNH anaplásico

O linfoma anaplásico de células grandes (ALC) é caracterizado por células grandes com nucléolos evidentes, citoplasma abundante e podem ser mono ou multinucleadas. O tumor cresce em mantos coesos e freqüentemente envolve os sinusóides, o que não se observa na DH. Além disso estes tumores são compostos por células que são usualmente menores que as da DH, com núcleos irregulares e os nucléolos não são tão evidentes nem têm halo perinuclear. Há, contudo, uma variante da esclerose nodular, sincicial, que, por ter mantos de células grandes, se pode confundir com DH ⁽²⁴⁾.

Os casos que estão histologicamente na fronteira entre a DH e o linfoma anaplásico de células grandes deverão ser distinguidos recorrendo à imuno-histoquímica e, se necessário, a estudos moleculares. A expressão de CD15 ou CD20 tendem a excluir o diagnóstico de linfoma anaplásico, enquanto que a expressão de CD45, antígenos T ou EMA tendem a excluir DH. Casos que não podem ser separados por imuno-histoquímica e biologia molecular deverão ser considerados inclassificáveis e caberá ao clínico decidir se repete a biópsia ou trata como DH ou LNH.

A categoria da classificação REAL designada como "ALC – Hodgkin's-like" pode ser dividida por métodos imunológicos ou moleculares em DH ou LNH e será eliminada na classificação da OMS.

REFERÊNCIAS

1. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 502-506.
2. Jackson H, JR, Parker F, JR. Hodgkin's disease and allied disorders. New York: Oxford University Press, 1947.
3. Lukes R, Butler J, Hicks E. Natural history of Hodgkin's disease as related to its pathological picture. *Cancer* 1966; 19:317-344.
4. Lukes R, Craver L, Hall T, Rappaport H, Ruben P. Report of the nomenclature committee. *Cancer Res.* 1966; 26:1311.
5. Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 1966; 26:1063-1081.
6. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary M, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84:1361-1392.
7. Poppema S, Kaiserling E, Lennert K. Nodular paragranuloma and progressively transformed germinal centers: ultrastructural and immunohistochemical findings. *Virchows Arch. [B]* 1979; 31:211-225.
8. Timmens W, Visser L, Poppema S. Nodular lymphocyte predominance type of Hodgkin's disease is a germinal center lymphoma. *Lab. Invest.* 1986; 54:457-461.
9. Stein H, Hansmann M, Lennert K, Brandtzaeg P, Gatter K, Mason D. Reed-Sternberg and Hodgkin cells in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease of nodular subtype contain J chain. *Am. J. Clin. Pathol.* 1986; 86:292-297.
10. Pinkus G, Said J. Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular - further evidence for a B cell derivation: L&H variants of Reed-Sternberg cells express L26, a pan B cell marker. *Am. J. Pathol.* 1988; 133:211-217.
11. Poppema S. The nature of the lymphocytes surrounding Reed-Sternberg cells in nodular lymphocyte predominance and in other types of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 1989; 135:351-357.
12. Schmid C, Sargent C, Lsaacson P. L and H cells of nodular lymphocyte predominant Hodgkin's disease show immunoglobulin light-chain restriction. *Am. J. Pathol.* 1991; 139:1281-1289.
13. Mason D, Banks P, Chan J, Cleary M, Delsol G, DE Wolf-Peeters C, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease: a distinct clinico-pathological entity. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994; 18:528-530.
14. Stoler M, Nichols G, Symbula M, Weiss L. Lymphocyte-predominance Hodgkin's disease. Evidence for a kappa light chain-restricted monotypic B-cell neoplasm. *Am. J. Pathol.* 1995; 146:812-818.
15. Braeuninger A, Kuppers R, Strickler J, Wacker H, Rajewsky K, Hansmann M-L. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:9337-9342.
16. Lebrun DP, Kamel OW, Dorfman RF, Warnke R. Enhanced staining for Leu M1 in Hodgkin's disease using secondary antibody for immunoglobulin M. *Am. J. Clin. Pathol.* 1992; 97(1):135-138.
17. Von Vasielowski, R, Mengel, M, Fischer, R, Hansmann, M-L, HUBNER, K, FRANKLIN, J, et al. Classical Hodgkin's disease: clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol* 1997; 151:1123-1130.
18. Zukerberg L, Collins A, Ferry J, Harris N. Co-expression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 1991; 139:475-483.
19. Ramsay A, Smith W, Lsaacson P. T-cell-rich B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988; 12:433-443.
20. Osborne B, Buttler J, Pugh W. The value of immunophenotyping on paraffin sections in the identification of T-cell rich B-cell large-cell lymphomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1990; 14:933-938.
21. Chittal S, Brousset P, Voigt J, Delsol G. Large B-cell lymphoma rich in T-cells and simulating Hodgkin's disease. *Histopathology* 1991; 19:211-220.
22. Delabie J, Vandenberghe E, Kennes C, Verhoef G, Foschi M, Stul M et al. Histiocyte-rich B-cell

lymphoma. A distinct clinicopathologic entity possibly related to lymphocyte predominant Hodgkin's disease, paraganuloma subtype. *Am. J. Surg. Pathol.* 1992; 16:37-48.

23. Kamel O, Gelb A, Shibuha R, AL, E. Leu-7 (CD57) reactivity distinguishes nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease from nodular sclerosing Hodgkin's disease, T-cell-rich B-cell lymphoma and follicular lymphoma. *Am. J. Pathol.* 1993; 142:541-546.

24. Strickler J, MICHIE S, Warnke R, Dorfman R. The "syncytial variant" of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 1986; 10:470-477.

15. MEDULA ÓSSEA – AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA

José Vassallo

ASPECTOS TÉCNICOS

O exame da medula óssea era feito tradicionalmente em preparados citológicos. Uma das razões era o fácil procedimento da punção esternal, realização do esfregaço e da coloração, quase que instantaneamente para análise. Nos preparados citológicos os detalhes morfológicos de células individuais são mais precisos que em tecidos fixados e incluídos em parafina. Além disto, em preparados citológicos é possível a realização de reações enzimáticas citoquímicas para a melhor classificação das células hemopoéticas (alfa-naftil butiratoesterase/NBE, peroxidase/Px, naftol AS-D cloroacetatoesterase/CAE, fosfatase alcalina/FAL e fosfatase ácida/FAC).

No entanto, algumas limitações deste método propiciaram o desenvolvimento da análise histológica: a impossibilidade de se avaliarem processos focais (infiltrações neoplásicas hematológicas ou não, granulomas, necrose), padrão de infiltração de processos linfoproliferativos, a real celularidade, trabéculas ósseas e alterações estromais, além da dificuldade de se obter material citológico em processos que cursam com certo grau de fibrose medular. Hoje, estes dois métodos devem ser vistos como **complementares**. O investimento no aprimoramento da técnica histológica e nos métodos complementares permitem melhor acuidade diagnóstica, mais importantes nos casos em que uma biópsia por agulha for o único material disponível para um diagnóstico o mais preciso possível.

A boa técnica de coleta em crista ilíaca é pressuposto de um diagnóstico mais preciso, devendo o fragmento ser de boa espessura e comprimento (cerca de 30 a 40 x 2 a 3 mm). A fixação é um passo essencial, já que, se for inadequada, haverá prejuízo tanto para a análise morfológica, quanto para a realização de técnicas especiais, como a imuno-histoquímica. Dependendo da experiência de cada serviço, os fixadores mais indicados têm sido a formalina tamponada a 10%, o B5, o Zenker/ácido acético e o Bouin. A descalcificação deve ser suave, preferencialmente em EDTA, ou por poucas horas em ácido nítrico a 5%. Outros métodos de descalcificação que preservam a morfologia e a imunogenicidade podem ser utilizados. Em nossa experiência, a fixação em Zenker/ácido acético glacial, na proporção 20:1 tem sido satisfatória, dispensando a descalcificação ⁽¹⁾. Qualquer que seja o método utilizado, não se deve **jamais** ultrapassar o período preconizado para cada fixador (24 horas para a formalina tamponada a 10% e o Zenker, 4 horas para o B5 e 12 horas para o Bouin). Cabe ao hematologista anotar data e horário de coleta da amostra, para que o patologista possa prosseguir adequadamente com o processamento.

A rigorosa atenção à boa técnica histológica permite bons resultados morfológicos, comparáveis aos da inclusão da medula em plástico sem prévia descalcificação. Este método é mais caro, exige micrótomo especial e pouco prático para um laboratório de Patologia Cirúrgica, no entanto, permite inclusive a utilização das reações enzimáticas histoquímicas para NBE, Px, CAE, FAL e FAC ⁽²⁾. Estas não são possíveis em tecidos fixados, com exceção da CAE e a FAC, que podem ser pesquisadas em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (mas não nos fixados em

Zenker, B5 e Bouin). Alguns autores preferem B5 para preservação de antígenos e bons resultados à imuno-histoquímica, com o que concordamos ⁽³⁾. No entanto, nossa experiência não justifica o argumento que o CD20/26, tão útil como marcador linfóide pan-B, não funcione bem em medulas fixadas em Zenker ou Bouin ⁽⁴⁾. Deve-se estar ciente, porém, que em medulas fixadas em Zenker é freqüente a marcação inespecífica de megacariócitos pelo CD20 em padrão citoplasmático difuso em muitos de nossos casos. Não encontramos uma razão para esta marcação aberrante.

1. AVALIAÇÃO DE METÁSTASES MEDULARES

O exame da medula óssea não é rotineiro na avaliação de metástases de neoplasias não hematológicas, com algumas exceções. O estadiamento dos neuroblastomas na infância inclui biópsia de medula, sendo que a associação do exame citológico com o histológico e o exame bilateral da medula aumentam a sensibilidade do método. Nos adultos, os carcinomas de mama e de pequenas células do pulmão também podem apresentar metástases medulares, porém não se chegou a um consenso sobre a utilidade do exame rotineiro da medula. Contudo, este está indicado em casos de suspeita clínica de infiltração medular, dada por: dor óssea, fraturas patológicas, lesões radiológicas líticas ou escleróticas, áreas suspeitas no mapeamento ósseo, hipercalcemia ou atividade de fosfatase alcalina sérica elevada e anomalias inexplicáveis ao hemograma. Além disto, em casos de indicação de transplante autólogo, o exame medular prévio também é importante ⁽⁵⁾.

Não cabe aqui fornecer detalhes morfológicos para o diagnóstico de infiltração medular, mas apenas as indicações do exame imuno-histoquímico, quais sejam: a distinção de neoplasias metastáticas (tumores sólidos X neoplasias hematológicas, como linfomas e leucemias, principalmente o linfoma de grandes células anaplásico e a leucemia megacarioblástica [LMA-M7]); a determinação da histogênese e/ou do sítio de origem de uma neoplasia epitelial; a detecção de microfocos metastáticos no estadiamento de uma neoplasia já conhecida.

Para a determinação da histogênese e do sítio de origem do tumor metastático, os procedimentos adotados devem ser idênticos a qualquer outro órgão estudado, utilizando-se os mesmos painéis ⁽⁶⁾ e outros capítulos deste livro). Como o fragmento de medula costuma ser pequeno e as metástases são processos focais que podem desaparecer com o aprofundamento dos cortes, é aconselhável que os cortes sejam realizados por técnico experiente e que as lâminas obtidas sejam numeradas, para que os anticorpos mais essenciais sejam testados nos primeiros cortes. Quando se trata de estadiar uma neoplasia já conhecida e classificada em outro órgão, pode-se utilizar um painel reduzido dirigido, por exemplo, citoqueratinas (amplo espectro, alto e baixo pesos moleculares) nos carcinomas de mama, pulmão, TGI, próstata, etc.; NSE (enolase neurônio-específica) e cromogranina para neuroblastomas. Cuidado deve ser tomado ao se utilizar o anticorpo policlonal para CEA (antígeno carcinoembrionário) em medula, pois este apresenta reatividade para a série granulocítica.

2. AVALIAÇÃO DE NÓDULOS LINFÓIDES E LINFOMAS

A utilidade da biópsia de medula óssea em pacientes portadores de linfomas malignos se dá principalmente no **diagnóstico**, já que em alguns casos os pacientes

apresentam apenas alterações hematológicas, que levam à indicação da biópsia, sem linfonodomegalia detectada de início; na **classificação**, principalmente nos casos em que o diagnóstico foi realizado primariamente na medula, na **extensão de infiltração** e na **avaliação pós-terapêutica** ⁽⁷⁾.

Nos **linfomas de alto grau de malignidade** os problemas diagnósticos podem incluir: diagnóstico diferencial com outras neoplasias indiferenciadas, tipagem imunológica ou detecção de pequenos focos não visualizados prontamente ao exame rotineiro de H&E. Para estes casos, os painéis adotados devem ser os mesmos que os indicados para outros órgãos.

Os maiores problemas surgem em relação aos **linfomas de baixo grau de malignidade**. Primeiramente, porque estes infiltram mais freqüentemente a medula que os de alto grau; depois, porque acometem mais freqüentemente indivíduos mais velhos, que também apresentam maior freqüência de nódulos linfóides reativos na medula. Outras situações que também cursam com maior freqüência de hiperplasia linfoplasmocitária na medula e com maior risco de desenvolvimento de linfomas incluem as imunodeficiências (adquirida viral, em indivíduos transplantados, ou congênitas) e os processos auto-imunes. Além disto, tanto nódulos linfóides reacionais, como associação com linfoma podem ocorrer em síndromes mieloproliferativas crônicas ou mielodisplásicas ⁽⁸⁾. Em todos estes casos, o diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides reativos X neoplásicos se impõe.

Os critérios puramente morfológicos apresentam limitações, com exceção dos casos em que a infiltração linfóide for evidentemente **paratrabecular**, critério seguro para o diagnóstico de linfoma. Para solucionar este problema diagnóstico, é de grande utilidade o estudo de Bluth et al. ⁽⁹⁾, utilizando dos anticorpos CD20/L26 e CD45RO/UCHL1 em 11 casos de linfomas de baixo grau e 73 casos de infiltrados linfóides reconhecidamente não neoplásicos. Estes autores encontraram um padrão homogêneo de coloração para o CD20 em todas as células linfóides em 8 dos 11 casos de linfoma, enquanto que os nódulos reacionais mostravam um misto de células marcadas para o CD20 e outras não. Neste estudo, encontrou-se intensa reação inespecífica de fundo e de elementos mielóides, impedindo uma avaliação adequada do CD45RO. É sabido que o CD45RO não é específico para linfócitos T, podendo marcar granulócitos maduros, monócitos, alguns linfomas de células B e alguns mieloblastos. No entanto, em nossa experiência tal reação de fundo e marcação de granulócitos impedindo a avaliação em cortes de medula não ocorre, em concordância com o estudo de Horny et al. ⁽¹⁰⁾, no qual foram avaliadas subpopulações linfóides em medulas normais, reativas e neoplásicas em cortes parafinados.

Outro instrumento considerado útil na diferenciação imuno-histoquímica de nódulos linfóides reativos e neoplásicos é o **bcl-2**, como relatado por Bem-Ezra et al. ⁽¹¹⁾ e corroborado por Chetty et al. ⁽¹²⁾. No primeiro artigo, foram estudados 26 casos de nódulos linfóides reativos, 19 linfomas foliculares e 10 linfomas linfocíticos/leucemia linfóide crônica. A expressão de bcl-2 em cortes parafinados de medula foi intensa ou moderada em apenas 1 caso de nódulo reativo, em contraste com 15 casos de linfoma folicular e 8 de linfoma linfocítico/LLC. Com isto, pode-se concluir que a positividade para bcl-2 em agregados linfóides suspeitos na medula fala a favor de neoplasia, enquanto que a negatividade fala por um processo hiperplásico. No artigo de Chetty e cols foram estudados 27 casos de medula consideradas negativas para o envolvimento de linfomas foliculares através das colorações rotineiras. A imunocoloração para bcl-2 ajudou a

encontrar um envolvimento difuso ou mini-agregados linfomatosos paratrabeculares em 5 destes casos, destacado o valor deste procedimento. No entanto, estudos mais recentes questionam esta aplicação do bcl-2, uma vez que este pode ser também expresso em nódulos linfóides reativos^(*). Portanto, a expressão de bcl-2 deve ser avaliada sempre em conjunto com os demais marcadores.

A **trama de células reticulares dendríticas**, revelada pelos anticorpos **CD21, CD35 e DR53** (aplicáveis em tecidos parafinados) também foi relatada como sendo de utilidade no diagnóstico diferencial de nódulos linfóides reativos e linfomas B de baixo grau⁽¹³⁾. Neste estudo, apenas 3 de 38 nódulos linfóides benignos apresentaram estas células, contra 92 de 134 linfomas B de baixo grau de malignidade.

Outros marcadores podem ser utilizados, como foi discutido no capítulo 13: o CD43, marcador T, tem expressão anômala em linfomas B, principalmente o de células do manto (em cerca de 60% dos casos); o CD5, também marcador pan-T, é expresso pela maioria das LLC-B e dos linfomas de células do manto. Ambos os marcadores podem ser aplicados em cortes parafinados⁽¹⁴⁾. Uma vez que o CD5 pode ser positivo tanto na LLC, quanto no linfoma de células do manto, pode-se lançar mão do anticorpo (de uso possível em cortes parafinados) para **ciclina D1 (bcl-1)**, que é expresso neste último com maior frequência que na LLC-B (72%, contra 6%, segundo Vasef et al.⁽¹⁵⁾).

A restrição de cadeias leves de imunoglobulinas é útil na diferenciação de plasmocitose reativa da infiltração intersticial por mieloma (considerar este dado em conjunto com outros clínicos e laboratoriais, uma vez que a gamopatia monoclonal benigna pode ser erroneamente interpretada como neoplasia) e também no reconhecimento do linfoma linfoplasmocítico, utilizando-se em conjunto o CD20, que marcará a população linfóide neoplásica^(16, 17).

A imunomarcagem pode ser utilizada para o diagnóstico e controle pós-tratamento de linfomas e leucemias linfóides de **infiltração intersticial**, padrão mais difícil de ser reconhecido pelo patologista em preparados rotineiros (H&E). Normalmente, a medula óssea apresenta esparsos linfócitos T e mais raros ainda linfócitos B^(18, 19). Mesmo em processos reativos, há linfocitose intersticial, mantendo-se aproximadamente a proporção 4:1 de linfócitos T e B. O aumento significativo de linfócitos B é sugestivo de linfoma⁽¹⁰⁾. A utilização do anticorpo **DBA-44** (pan-leucocitário B restrito) é muito útil no diagnóstico e seguimento pós-terapia da tricoleucemia, utilizado em conjunto com o CD20^(20,21). Os marcadores para linfócitos B também podem detectar o padrão sinusoidal de acometimento pelo linfoma esplênico, importante no seu diagnóstico⁽²²⁾. Marcadores linfóides T (CD45RO e CD3) podem ser úteis na detecção de infiltração por linfomas T, geralmente subestimadas ao exame rotineiro^(23,24). O diagnóstico de doença de Hodgkin na medula também pode ser confirmado através dos anticorpos **CD30 e CD15**, sendo que deve-se ter cuidado na interpretação deste último marcador, já que os granulócitos são fortemente marcados por ele^(25,26). O uso do marcador **CD30** é também significativo, em associação ao anti-EMA, na detecção de infiltração pelo linfoma anaplásico de grandes células não diagnosticada às colorações rotineiras (23% dos casos no estudo de Fraga e cols), uma vez que este fato representa pior prognóstico para o paciente⁽²⁷⁾.

(*) Ver SKALOVA A, FAKAN F, *J Clin Pathol* 1997; **50**: 87-88, para discussão sobre o artigo de Chetty et. al, bem como resposta do autor.

3. IMUNOFENOTIPAGEM DE LEUCEMIAS AGUDAS EM CORTES PARAFINADOS

A técnica ideal para imunofenotipagem de leucemias se aplica aos preparados citológicos (sobre lâminas citológicas ou por citometria de fluxo). No entanto, em alguns casos, dispõe-se apenas do corte histológico para tanto, como naqueles em que pouca ou nenhuma quantidade de blastos analisáveis foi conseguida, devido à diluição do aspirado ou à intensa fibrose (mais freqüente no tipo M7 da LMA, mas que pode ocorrer também em outros tipos), ou ainda ao acometimento focal pelos blastos. Nestas situações, a imunofenotipagem auxilia na classificação mais exata da leucemia, razão pela qual estudos têm sido realizados em cortes histológicos de tecido congelado⁽²⁸⁾ ou processados rotineiramente^(25,26,29-32). Nestes estudos, uma gama de anticorpos aplicáveis em parafina são avaliados. Passaremos a detalhar propriedades de alguns anticorpos na classificação de leucemias agudas:

- **CD45 (antígeno leucocitário comum):** marca as séries linfóides B e T, porém pode marcar também leucemias mielóides agudas/sarcoma granulocítico⁽³³⁾ e mastócitos.
- **Marcadores de células linfóides B:** O **CD20/L26** tem sensibilidade mais baixa nas leucemias e linfomas de células B precursoras (linfoblásticos) que em outros linfomas de células B, inclusive o tipo Burkitt (e LLA-L3). Segundo Arber e Jenkins⁽³¹⁾, o CD20 marcou apenas 6 de 18 LLA de células B precursoras (33%). Porém sua especificidade foi alta, já que não marcou nem LMA, nem LLA de células T. Por outro lado, o **CD79a**, que tem sido descrito como um bom marcador de células B aplicável em parafina, marcou 16 de 18 LLA-B (89%), porém não se revelou linhagem específico, já que marcou também 11 de 48 LMA (23%). Porém, associando-se o CD79a à mieloperoxidase, pode-se excluir a maioria dos casos de LMA, se este último marcador for positivo.
- **Marcadores de células linfóides T:** É esperado que o **CD45RO/UCL1** seja positivo em cerca de 50% de LLA-T, mas também em cerca de 25% de LMA⁽²⁹⁾. O **CD3** e o **CD43** mostraram 100% de reatividade nas LLA-T (6 casos estudados) no trabalho de Arber e Jenkins⁽³¹⁾. No entanto, enquanto o CD3 não marcou células das LMA ou LLA-B, o CD43 foi positivo em 46/48 (96%) LMA e em todos os 18 casos de LLA-B, não podendo ser considerado linhagem específica, também nesta situação.
- **Marcadores para a linhagem mielo-monocítica:** a **lisozima** é um marcador tanto para a linhagem granulocítica, quanto para a monocítica. Tem valor quando positivo, já que em nossa experiência, apenas metade dos casos classificados como LMA demonstraram positividade para lisozima⁽³⁴⁾, de acordo com outros estudos⁽²⁹⁾. Mais recentemente, o uso da **mieloperoxidase** revelou positividade em 96% das LMA (46/48 casos), mas também em 3/18 (17%) casos de LLA-B⁽³¹⁾. O **CD68/KP1** marcou 77% (37/48) das LMA, mas também 2/18 (11%) casos de LLA-B⁽³¹⁾. Este marcador pode ser positivo em tricoleucemias e em neoplasias não hematopoéticas, como o melanoma⁽²⁹⁾. Outros marcadores mielo-monocíticos aplicáveis em parafina incluem a elastase, o CD15 e o Mac387, estes dois últimos com menor sensibilidade que a lisozima em nossa experiência. Não é possível subtipar de acordo com a classificação FAB as LMA de M0 a M5 em cortes parafinados, pois nenhum destes marcadores permite separar as séries granulocítica da monocítica^(29,30).
- **Marcadores da linhagem eritroblástica:** são aplicáveis em parafina anticorpos para a glicoforina A, hemoglobina e Ulex europaeus, sendo que este último está presente também na série megacariocítica e endotélio. Em nossa experiência, marcadores

para a **glicoforina A** e **hemoglobina** são mais freqüentemente reativos para as células mais maduras, que podem ser reconhecidas morfológicamente (H&E, Giemsa), limitando seu uso no diagnóstico morfológico de LMA-M6. Além disto, este diagnóstico requer critérios de contagem diferencial de blastos, melhor realizável no exame citológico.

- **Marcadores da linhagem megacarioblástica:** o diagnóstico de leucemia megacarioblástica (LMA-M7) é o que mais pode causar problemas, pois a freqüente fibrose impede a obtenção de material citológico adequado. Já pudemos demonstrar a utilidade do anticorpo para o **fator VIII** no diagnóstico de M7 ⁽³⁵⁾. Outro anticorpo para esta série utilizável em cortes parafinados é o dirigido para o **CD61-glicoproteína IIIa** ⁽³⁶⁾. Em nossa experiência, este é aplicável em medulas fixadas em B5 e descalcificadas em EDTA ⁽³⁾, porém não em medulas fixadas em Zenker, mesmo com recuperação antigênica ⁽⁴⁾.
- **Outros marcadores:** O **CD34** marca células endoteliais e, na medula óssea normal, raras células hematopoéticas totipotentes (precursoras imaturas). No estudo de Arber e Jenkins ⁽³¹⁾ o anti-CD34 reagiu com 16/48 (33%) das LMA, 13/18 (72%) LLA-B e 2/6 (33%) LLA-T. Vários estudos mostraram a utilidade do anticorpo anti-CD34 no auxílio diagnóstico das síndromes mielodisplásicas em biópsias, bem como na avaliação do prognóstico ⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. O anticorpo para **transferase deoxinucleotidil terminal (TdT)** mostra reatividade para células precursoras B e T, mas não para células linfóides mais maduras; por isto, é útil no diagnóstico de neoplasias de células precursoras ^(41,42). Este marcador foi positivo em todos os casos de LLA, tanto B, quanto T, e em 13% das LMA ⁽³¹⁾. O CD34 e o TdT são úteis tanto no diagnóstico de leucemia aguda, quando presentes, quanto na detecção de focos de células leucêmicas não prontamente visualizados nas colorações rotineiras. O **CD99** foi utilizado primeiramente no diagnóstico de sarcoma de Ewing/PNET, mas mostrou-se útil no diagnóstico de linfomas/leucemias linfoblásticas. Pode ser detectado também em timomas. Atualmente existem anticorpos que detectam estes três marcadores em parafina, após recuperação antigênica ⁽⁴³⁾.

Dada a superposição de marcação em diferentes linhagens celulares, estes marcadores aplicáveis em parafina não se prestam para o diagnóstico de leucemias agudas mistas, o que deve ser feito em estudos citológicos (imuno-citoquímica ou citometria de fluxo, ver capítulo 16). Outrossim, atenção deve ser dirigida à interpretação de reações com alguns anticorpos para neoplasias não hemopoéticas, como a vimentina, HMB-45, mioglobina, actina, tireoglobulina, CEA e NSE, que podem corar blastos leucêmicos em porcentagem variada de casos (44). Portanto, a interação com a clínica, com os preparados citológicos e a ampliação dos painéis para incluir as leucemias agudas no diagnóstico diferencial destes tipos de neoplasias indiferenciadas permitem minimizar falsas interpretações.

Não podemos concluir este capítulo, sem mencionar que também na medula óssea, como em qualquer outro tecido, a pesquisa de microorganismos pode ser decisiva na condução de um caso clínico ⁽⁴⁵⁾ e capítulos pertinentes deste livro).

Resumimos na Tabela 1 nossa experiência com a indicação da imuno-histoquímica na solução de problemas diagnósticos em patologia medular.

Tabela 1 - Imuno-histoquímica em medula óssea. Indicações e resultados(*)		
INDICAÇÕES	CONCLUSIVOS	INCONCLUSIVOS
Mileoma X Plasmocitose 72 (27,8%)	72 (27,8%) Plasmocitose: 53 Mieloma: 19	0
Tipagem de linfoma e nódulos reativos 67 (25,8%)	64 (24,7%) Linfoma B: 23 Tricoleucemia: 10 Linfomas T: 9 L. Hodgkin: 1 Nódulos reat.: 21	3 (1,1%)
Avaliação de metástases 45 (17,4%)	37 (14,3%) Presente: 12 Ausente: 25	8 (3,1%)
Tipagem de leucemias 42 (16,2%)	27 (10,4%) LMA: 24 LLA: 1 LMMC: 2	15 (5,8%) Leuc. Aguda: 13 LLA: 2
Pesquisa de infiltração intersticial por linfoma 29 (11,2%)	28 (10,8%) Positiva: 3 Negativa: 25	1 (0,4%)
Neoplasias indiferenciadas 4 (1,5%)	0	4
TOTAIS	228 (88%)	31 (12%)

(*) Dados do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP, cobrindo janeiro de 1995 a dezembro de 1997, coletados pela Dra. Cintia Nogueira Aleixo.

Exames de medula no período (1995-1997) ➡ 627

Exames imuno-histoquímicos neste material ➡ 259 (38,5%)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gatter KC, Heryet A, Brown DC, Mason DY. Is it necessary to embed bone marrow biopsies in plastic for haematological diagnosis? *Histopathology* 1987; 11: 1-7.
2. Beckstead JH, Halverson PS, Ries CA, Bainton DF. Enzyme histochemistry and immunohistochemistry on biopsy specimens of pathologic human bone marrow. *Blood* 1981; 57: 1088-1098.
3. Castelli JB, Reis MM, Silva LMMF, et al. Fixador B5 e descalcificador EDTA-HCl no processamento de biópsias de medula óssea com bons resultados no estudo imuno-histoquímico. XIX Congresso Brasileiro de Patologia, Santos-SP, 25 a 30/7/1993. Ver. Pta. Med. 1993; 9.4 (suplemento especial).
4. Vassallo J, Pinto GA. Letter: a panel of antibodies for the immunostaining of Böium's fixed bone marrow trephine biopsies. *J. Clin. Pathol.* 1998; 51: 638-640.
5. Bain BJ, Clark DM, Lampert IA. Bone marrow Pathology, 2nd. Ed., Blackwell Science 1996; Oxford, capítulo 9.
6. Gown AM, Bacchi CE. Cost effective immunohistochemistry. Short Course no Congresso da United States and Canadian Academy of Pathology 1998; Handout.
7. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R. Bone marrow biopsies revisited. 2nd. Ed., Karger, Basel 1985; capítulos 7 e 8.
8. Moraes SL, Lorand-Metze I, Vassallo J. Síndrome mieloproliferativa associada a infiltrado linfóide atípico sugestivo de linfoma não Hodgkin de baixo grau. Relato de um caso e revisão da literatura. XXII Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 1996; Porto Alegre, RS – 27 a 30/10. Boletim Soc Brasil Hemat Hemoter XVIII 1996; (Supl.): 141-P.
9. Bluth R F, Casey TT, McCurley TL. Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle preparations using L-26 (CD20) and UCHL-1 (CD45RO) monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; 99: 150-156.
10. Horny H-P, Wehrmann M, Griesser H, et al. Investigation of bone marrow lymphocytic subsets in normal, reactive and neoplastic states using paraffin-embedded biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; 99: 142-149.
11. Ben-Ezra JM, King B E, Harris AC, et al. Staining for bcl-2 protein helps to distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow biopsies. *Mod. Pathol.* 1994; 7: 560-564.
12. Chetty R, Echezarreta G, Comley M, Gatter K. Immunohistochemistry in apparently normal bone marrow trephine specimens from patients with nodal follicular lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 1035-1038.
13. Meuge-Moraw C, Delacretaz F, Baur AS. Follicular dendritic cells in bone marrow lymphoproliferative diseases: an immunohistochemical study including a new paraffin-resistant monoclonal antibody, DR53. *Histopathology* 1996; 28: 341-347.
14. Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's Lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102: 825-834.
15. Vasef MA, Medeiros L J, Koo C, et al. Cyclin D1 immunohistochemical staining is useful in distinguishing mantle cell lymphoma from other low grade B-cell neoplasms in bone marrow. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 108: 302-307.
16. Peterson LC, Brown BA, Crosson JT, Mladenovic J. Application of the immunoperoxidase technique to bone marrow trephine biopsies in the classification of patients with monoclonal gammopathies. *Am. J. Clin. Pathol.* 1996; 85: 688-693.
17. Thiele J, Arez B, Klein H, et al. Differentiation of plasma cell infiltrates in the bone marrow. A clinicopathological study on 80 patients including immunohistochemistry and morphometry. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histopathol.* 1988; 412: 553-562.
18. Shin SS, Sheibani K, Kezirian J, et al. Immunoarchitecture of normal human bone marrow: a study of frozen and fixed tissue sections. *Hum. Pathol.* 1992; 23: 686-694.

19. O'Donnell LR, Alder SL, Balis UJ, et al. Immunohistochemical reference ranges for B lymphocytes in bone marrow biopsy paraffin sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995; 104: 517-523.
20. Hounie H, Chittal SM, AL Saati T, et al. Hairy cell leukemia: diagnosis of bone marrow involvement in paraffin-embedded sections with monoclonal antibody DBA-44. *Am. J. Clin. Pathol.* 1992; 98: 26-33.
21. Lorand-Metze I, Lima CSP, Cardinalli I, Vassallo J. Association of a myelodysplastic syndrome with hairy cell leukemia. *Eur. J. Haematol.* 1995; 55: 341-343.
22. Franco V, Florena AM, Campesi G. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996; 29: 571-575.
23. Salhany KE, Greer JP, Cousar JB, Collins RD. Marrow involvement in cutaneous T-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 60 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989; 92: 747-754.
24. Caulet S, Delmer A, Audouin J, et al. Histopathologic study of bone marrow biopsies in 30 cases of T-cell lymphoma with clinical, biological and survival correlations. *Hematol. Oncol.* 1990; 8: 155-168.
25. Van Der Valk P, Mullink H, Huijgens PC, et al. Immunohistochemistry in bone marrow diagnosis. Value of a panel of monoclonal antibodies on routinely processed bone marrow biopsies. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989; 13: 97-106.
26. Gala J-L, Chenut F, Hong K BT, et al. A panel of antibodies for the immunostaining of Bouin's fixed bone marrow trephine biopsies. *J. Clin. Pathol.* 1997; 50: 521-524.
27. Fraga M, Brousset P, Schlaifer D, et al. Bone marrow involvement in anaplastic large cell lymphoma. Immunohistochemical detection of minimal disease and its prognostic significance. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995; 103: 82-89.
28. Falini B, Martelli MF, Tarallo F, et al. Immunohistological analysis of human bone marrow trephine biopsies using monoclonal antibodies. *Br. J. Haematol.* 1984; 56: 365-386.
29. Perkins SL, Kjeldsberg CR. Immunophenotyping of lymphomas and leukemias in paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; 99: 362-373.
30. Horny H-P, Wehrmann M, Steinke B, Kaiserling E. Assessment of the value of immunohistochemistry in the subtyping of acute leukemia on routinely processed bone marrow biopsy specimens with particular reference to macrophage-associated antibodies. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 810-814.
31. Arber DA, Jenkins KA. Paraffin section immunophenotyping of acute leukemias in bone marrow specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1996; 106: 462-468.
32. Chuang SS, LI CY. Useful panel of antibodies for the classification of acute leukemia by immunohistochemical methods in bone marrow trephine biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 107: 410-418.
33. Vassallo J, Altemani AM, Cardinalli IA, et al. Granulocytic sarcoma of the larynx preceding chronic myeloid leukemia. Report of one case. *Pathol. Res. Pract.* 1993; 189: 1084-1086.
34. Lima CSP. Estudo da medula óssea em leucemia mielóide aguda do adulto e suas correlações clínicas e laboratoriais. Tese de Doutorado. Souza C A (Orientador) e Vassallo J (Co-orientador). Universidade Estadual de Campinas 1992; S.Paulo.
35. Lorand-Metze I, Vassallo J, Aoki RY, Souza CA. Acute megakaryoblastic leukemia: importance of bone marrow biopsy in diagnosis. *Leuk Lymphoma* 1991; 4: 75-79.
36. Gatter KC, Cordell JL, Turley H, et al. The immunohistological detection of platelets, megakaryocytes and thrombi in routinely processed specimens. *Histopathology* 1988; 13: 257-267.
37. Horny HP, Wehrmann M, Schlicker HU, et al. QBEND10 for the diagnosis of myelodysplastic syndromes in routinely processed bone marrow biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 291-294.
38. Oriani A, Annaloro C, Soligo D, et al. Bone marrow histology and CD34 immunostaining in the prognostic evaluation of primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1996; 92: 360-364.
39. Orazi A, Albitar M, Heerema NA, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anemia by CD34 and PCNA immunostaining of bone marrow biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 107: 268-274.

40. Lambertenghi Delilliers G, Annaloro C, Soligo D, Oriani A . The diagnostic and prognostic value of bone marrow immunostaining in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 231-239.
41. Chilosi M, Pizzolo G. Review of TdT. Biological aspects, methods of detection and selected diagnostic applications. *Applied Immunohistochemistry* 1995; 3: 209-221.
42. Orazi A, Cotton J, Cattoretti G, et al. TdT staining in acute leukemia and normal bone marrow in routinely processed paraffin sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102: 640-645.
43. Vartanian RK, Sudilovsky D, Weidner N. Immunostaining of monoclonal antibody O13 (anti-mic 2 gene product/CD99) in lymphomas. Impact of heat-induced epitope retrieval. *Applied Immunohistochemistry* 1996; 4: 43-55.
44. Ruck P, Horny HP, Greschniok A, et al. Nonspecific immunostaining of blast cells of acute leukemia by antibodies against nonhemopoietic antigens. *Hematol. Pathol.* 1995; 9: 49-56.
45. Brouland JP, Audouin J, Hofman P, et al. Bone marrow involvement by disseminated toxoplasmosis in AIDS: the value of bone marrow trephine biopsy and immunohistochemistry for the diagnosis. *Hum. Pathol.* 1996; 27: 302-306.

LEUCEMIAS AGUDAS

A classificação das leucemias agudas, nos dias de hoje, é baseada em critérios morfológicos (citológicos) citoquímicos e marcadores imunológicos ⁽¹⁻³⁾. Trata-se de um grupo heterogêneo de neoplasias, que tem sua origem nos precursores hemopoiéticos/linfóides. Seu diagnóstico diferencial com síndromes mielodisplásicas se faz pela presença de mais de 30% de blastos no mielograma ⁽²⁾. As células de origem, nos diversos casos, localizam-se em vários níveis de diferenciação do sistema linfo-hemopoiético. A determinação da linhagem de origem e do grau de diferenciação dos blastos leucêmicos em cada paciente é importante para orientar o tratamento (quimioterapia e transplante de medula), bem como o prognóstico. O sistema de classificação usado universalmente é o proposto pelo Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) que divide as leucemias agudas em linfóide e não linfóide ou mielóide ⁽⁴⁾. No segundo grupo, dividido em 8 tipos básicos (tabela 1) a abordagem é basicamente citológica e citoquímica. O uso dos marcadores imunológicos, embora aplicado em numerosos Serviços, apresenta indicações muito específicas. Ao contrário, na leucemia linfóide aguda (LLA), tanto a que ocorre na infância, como na do adulto, a imunofenotipagem tem um papel crucial. A morfologia serve apenas para a detecção da LLA FAB-L3 ou de células de Burkitt (origem B). Nos outros casos, que são a maioria, (97% dos casos) a morfologia dos blastos, bem como suas características citoquímicas, não apresentam uma importância definida para tratamento e prognóstico.

A classificação da leucemia aguda é realizada de preferência no material citológico obtido por aspirado de medula óssea. Os diversos tipos FAB na LMA são baseados nesta análise. Pode-se, porém, usar material de sangue periférico para análise citoquímica ou imunofenotipagem, desde que os blastos sejam a população majoritária de leucócitos no sangue periférico.

ROTEIRO DIAGNÓSTICO NAS LEUCEMIAS AGUDAS.

Entre as várias propostas existentes, a que nos parece mais simples, lógica e prática (e a que usamos no nosso Serviço; tabela 2) é a descrita pelo Conselho Internacional de Padronização em Hematologia ⁽¹⁾. Esta padronização é baseada na análise morfológica da medula óssea, corada por uma substância pancromática do tipo Romanowsky (Giemsa, Leishman, Wright, etc), num pequeno número de reações citoquímicas (peroxidase, Sudan Black ou cloroacetado-esterase, PAS-Periodic acid Schiff e alfa-naftil-acetato esterase) e num painel restrito de anticorpos monoclonais (inicialmente em lâmina e, se necessário, na citometria de fluxo). Estes devem ser usados apenas quando a peroxidase e/ou a alfa-naftil-acetato-esterase são negativas nos blastos. Este roteiro visa um poder diagnóstico e reprodutibilidade de 95% dos casos de leucemias agudas, para laboratórios de rotina que não dispõem de técnicas muito sofisticadas.

Roteiro diagnóstico

1. Morfologia básica - Analisar a porcentagem e morfologia dos blastos, bastonetes de Auer, precursores granulocíticos mais maduros, eritroblastos, megacariócitos (inclusive micromegacariócitos). Descrição de eventuais atipias celulares encontradas.

2. Técnicas citoquímicas (para detalhes técnicos ver referência 1) - A peroxidase ou o Sudan B coram blastos de origem mieloide (mieloblastos). Considera-se positiva a reação quando mais que 30% dos blastos são positivos.

A alfa-naftil-acetato esterase evidencia os monoblastos da leucemia monocítica (FAB-M5) e da leucemia mielomonocítica (FAB-M4) onde sua proporção deve estar acima de 20% ao lado dos blastos positivos para peroxidase. A esterase cora ainda eritroblastos e megacariócitos e seus precursores.

A reação do PAS, que tem sido tradicionalmente usada no diagnóstico da LLA, na realidade é altamente inespecífica, já que mieloblastos podem apresentar uma granulação fina PAS positiva. Por outro lado, na LLA caracterizada por marcadores imunológicos, os blastos podem ser PAS negativos.

Quando os blastos leucêmicos são peroxidase e alfa-naftil-acetato esterase negativos, deve-se lançar mão de um painel de anticorpos monoclonais, com o fim de diagnosticar a LLA, a LMA FAB-MO e outros tipos menos freqüentes e com características mais aberrantes.

3. Imunofenotipagem (para detalhes técnicos ver referências 7 e 15) – A assim chamada imunofenotipagem baseia-se no princípio de que os blastos leucêmicos conservam determinadas características antigênicas celulares (membrana, citoplasma ou mesmo núcleo) que são observadas nos precursores hemopoiéticos e linfóides normais, e que permitem identificar a linhagem e o grau de diferenciação das diversas células. Em geral, os anticorpos usados evidenciam proteínas ou polipeptídeos com função de enzimas, receptores de membrana, etc. Estas substâncias podem ser identificadas na membrana, ou serem intracitoplasmáticas ou intranucleares. O único marcador intranuclear usado no diagnóstico das leucemias agudas é a TdT (enzima deoxinucleotidil transferase terminal). Ela é encontrada em células imaturas, tanto da linhagem hemopoiética como linfóide. Na linhagem hemopoiética ela está presente até o mieloblasto, sendo negativa nos promielócitos e células mais maduras. Na linhagem linfóide, tanto B quanto T, também é característica dos elementos mais indiferenciados. No processo de diferenciação celular, a TdT é perdida primeiro na linhagem B. Na linhagem T, ela é conservada até o timócito maduro. As células T periféricas não apresentam mais este marcador ⁽⁵⁾.

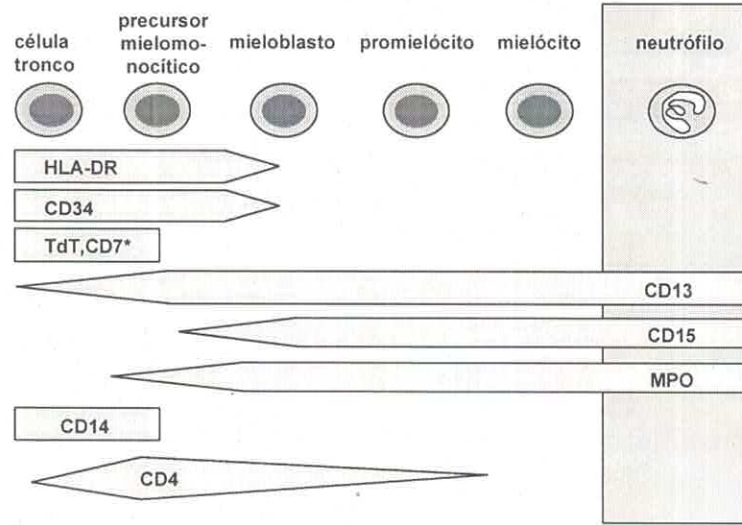
Em relação aos outros antígenos, a maioria é estudada a nível de membrana. Este aspecto fez com que a citometria de fluxo tenha sido tão amplamente usada na imunofenotipagem das leucemias agudas. É um método usado em suspensão de células, que permite analisar rapidamente um grande número destas, separar subpopulações dentro da medula óssea, e estudar simultaneamente características físicas/morfológicas e antigênicas das células. É usada, porém, preferencialmente para antígenos de membrana. Tem, no entanto, a desvantagem de só poder ser usada em células recém colhidas e a amostra não poder ser estocada para permitir nova análise do material.

Por outro lado, a imuno-citoquímica, método semelhante ao usado em Anatomia Patológica, permite evidenciar os marcadores celulares em esfregaços ou preparações de citocentrífuga ("citospins"). São preparações permanentes, que permitem revisão. Permitem estudar antígenos de membrana ou intracitoplasmáticos. Mas analisam poucas células. Estas técnicas podem ser usadas em material recém-preparado ou amostras congeladas.

Em geral, um mesmo antígeno (por ex.: mieloperoxidase, CD3 ou imunoglobulinas) aparece primeiramente no citoplasma da célula, para depois ser expresso na membrana das células mais diferenciadas.

Como as leucemias são processos neoplásicos que sempre cursam com alterações do genoma, é possível haver variações no seu padrão antigênico em relação ao encontrado nas células normais, com perda de antígenos, ou co-expressões aberrantes. Se, de um lado, estas alterações dificultam a interpretação dos resultados obtidos com a imunofenotipagem ao diagnóstico, por outro lado co-expressões aberrantes permitem identificar o clone leucêmico mesmo que em baixa proporção na medula óssea e assim rastreá-lo após o tratamento quimioterápico ou o transplante. Assim, esta característica permite o estudo da doença residual mínima. O padrão antigênico normal dos precursores hemopoiéticos e linfóides tem sido amplamente descrito na literatura ^(5,6,7). Discutiremos aqui apenas os marcadores mais importantes usados no diagnóstico das leucemias (Figuras 1 e 2).

Série granulocítica



Série monocítica

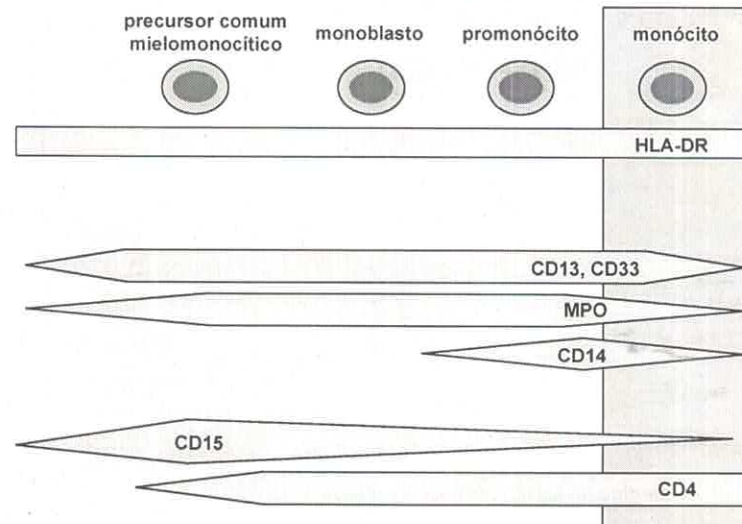
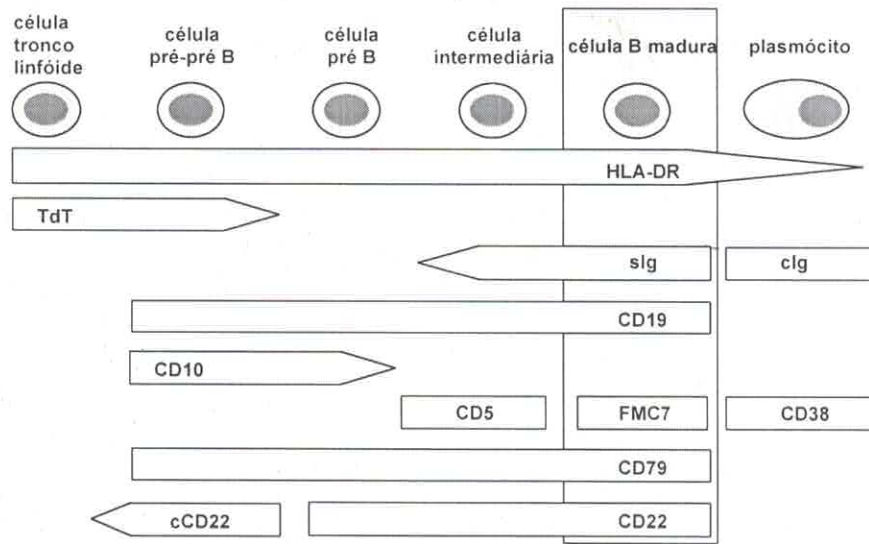
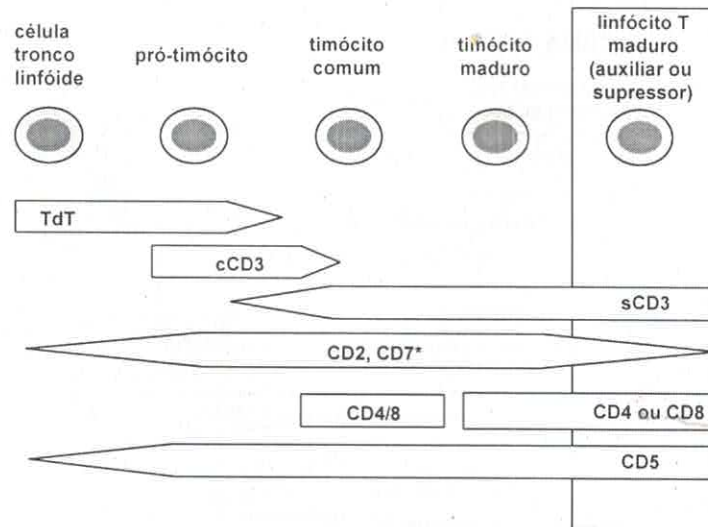


Fig 1: Marcadores celulares na linhagem mielo-monocítica

Diferenciação celular B



Diferenciação celular T



* CD7 é perdido no estágio final da maturação T

Fig 2: Marcadores celulares no sistema linfóide

Marcadores mielóides

Os mais usados são a mieloperoxidase (MPO) e os CD33, CD13, CD14 e CD15. A MPO é o marcador mais específico da linhagem granulocítica e é o que aparece mais precocemente. É tipicamente um marcador citoplasmático e só pode ser usado na citometria de fluxo usando-se técnicas de permeabilização⁽⁸⁾. Entre os outros, o CD33 e/ou o CD13 são positivos na maioria dos casos de LMA.

Embora o CD14, o CD68 e o CD4, estejam associados à linhagem monocítica, não existe nenhum marcador imunológico que faça com segurança o diagnóstico diferencial entre os tipos FAB-M1 e FAB-M5. Neste ponto, a citoquímica (alfa-naftil-acetato-esterase) é o marcador mais específico da linhagem monocítica. Mas é preciso lembrar que há casos de FAB-M5 que são negativos para este marcador⁽¹⁾.

A linhagem eritróide (eritroblastos e hemácias) podem ser evidenciados pelo anticorpo anti-glicoforina A, embora a maioria dos elementos desta linhagem sejam identificáveis no exame morfológico convencional.

A caracterização dos precursores megacariocíticos, que ocorrem na LMA FAB-M7 pode ser problemática. O padrão-ouro para se atribuir a blastos leucêmicos a origem megacariocítica é a evidenciação da peroxidase plaquetária à microscopia eletrônica⁽²⁾. Esta técnica, porém, é restrita a poucos laboratórios de pesquisa. Na rotina usa-se os anticorpos CD61 (Gp IIIa) e CD41 (Gp IIb - IIIa) que geralmente são positivos nos megacarioblastos. O primeiro aparece mais precocemente⁽⁹⁾. Uma proporção dos megacarioblastos é negativa tanto para CD61, como para CD41, apesar de se poder evidenciar a peroxidase plaquetária à microscopia eletrônica. Na prática, porém, o problema maior é a falsa positividade de blastos de outras linhagens à citometria de fluxo. Este fenômeno se deve à aderência de plaquetas a estes blastos, e pode ser reduzido quando colhemos o material com EDTA⁽¹⁰⁾.

Apesar deste recurso, o melhor é usar sempre a imuno-citoquímica em lâminas e não a citometria de fluxo para identificar a LMA FAB-M7. Em muitos casos, como não se consegue aspirar medula óssea para análise, o diagnóstico é buscado em cortes histológicos (ver capítulo 15).

Em relação à LMA ainda é preciso lembrar que o tipo FAB-MO é caracterizado pela negatividade ao Sudan B (tabela 1) e positividade para MPO e/ou CD33 ou CD13, além de positividade para CD34 HLA-DR e CD7, indicando sua imaturidade. Sabe-se que o CD7, descrito inicialmente na linhagem linfóide T, ocorre nos blastos mais imaturos da linhagem mielo-monocítica tanto nos normais quanto nos leucêmicos⁽⁵⁾. Por isso não pode ser considerado linhagem-específico. Recentemente tem-se descrito a positividade para CD19 (um marcador pan-B) na LMA FAB-M2, em associação com a t(8;21), que é um marcador citogenético de bom prognóstico. Por esta razão, o CD19 tem sido considerado menos linhagem-específico para o diagnóstico de leucemia bifenotípica que o CD22.

O diagnóstico de LMA FAB M-3 (leucemia promielocítica) é especialmente importante, já que possui um marcador citogenético t(15;17) e molecular próprio (rearranjo no receptor alfa do ácido retinóico). Além disso, está associada a uma coagulopatia de consumo e é sensível ao tratamento com ATRA (ácido ALL-trans-retinóico), sendo o tipo de LMA de melhor prognóstico. Em geral, o diagnóstico é simples,

e baseado na morfologia convencional (tipo clássico, hipergranular, com numerosos bastonetes de Auer), mas há formas variantes ⁽¹¹⁾. A mais freqüente, já incluída na proposta FAB, é a chamada M3v (variante hipogranular) onde se vê células com núcleo chanfrado, abundante citoplasma claro, com poucos grânulos, mas fortemente positivas ao Sudan B ou à peroxidase. Formas menos freqüentes são semelhantes ao tipo FAB-M2 (blastos e promielócitos só) ou ao tipo FAB-M1 (células hipergranulares, mas com citoplasma mais escasso). Todos estes tipos têm o mesmo marcador genético e molecular, e o mesmo comportamento clínico e prognóstico. Do ponto de vista dos marcadores imunológicos, é preciso salientar que HLA-DR e CD34 são negativos ou fracamente positivos. Uma certa proporção dos casos apresenta positividade para CD2, sem que se trate de leucemia bifenotípica.

Marcadores linfóides

Como já foi dito, a imunofenotipagem na LLA é de capital importância, já que é o único meio de se diferenciar tipos de diferente resposta a tratamento e prognóstico. É o tipo de leucemia aguda mais comum na infância, perfazendo 25% das neoplasias da infância ⁽²⁾. No adulto, a LLA compreende 20% dos casos de leucemias agudas.

Inicialmente, a LLA pode ser dividida em casos de origem B (CD19, CD20 ou CD22 positivos) ou T (CD3 positivos). Mas em cada um destes grupos, pode-se identificar diversos subtipos quanto ao estado de diferenciação celular. Estes têm importância terapêutica. Dentro da linhagem B tem sido descritos 3 a 4 tipos. Numa recente revisão, Jennings e Foon ⁽²⁾ dividem a LLA em B-precursora, pré-B e B.

A **LLA-B precursora** é a mais comum em crianças (65% a 70%) e adultos (50%). É caracterizada pelo fenótipo: TdT, HLA-DR e CD19. Pode ser CD10⁺ ou CD10⁻, a primeira com melhor prognóstico. É também CD34⁺, mas não tem expressão de imunoglobulinas. A LLA de lactentes que apresenta CD19⁺, CD10⁻ e CD15⁺, está associada a translocações cromossômicas envolvendo 11q23 e um mau prognóstico ⁽²⁾. É neste tipo de LLA (B-precursor) que podemos encontrar os pacientes com t(9;22). Esta alteração citogenética ocorre em 30% das LLAs de adultos e 3%-5% dos casos infantis e confere mau prognóstico ⁽²⁾.

A **LLA-pré B** representa um tipo B mais maduro. Seu fenótipo é CD19, CD24, HLA-DR, e CD22 citoplasmático e CD10 (sempre positivo). TdT pode ser positiva ou negativa, mas CD34 é negativo. Este subtipo é caracterizado pelo encontro da cadeia pesada μ intracitoplasmática (cIgM). Este subtipo tem prognóstico pior que o tipo anterior e está associada à t(1;19).

LLA B madura corresponde morfológicamente à LLA FAB-L3 ou leucemia de células de Burkitt. Representa 2% a 5% dos casos de LLA e está associada a translocações envolvendo o oncogene C-MYC. Seu fenótipo é positivo para um anticorpo pan-B (CD19, CD20 ou CD22) e imunoglobulinas monoclonais de superfície (geralmente IgM). Muitos destes casos são CD10⁺ e HLA-DR⁺, mas sempre CD34 e TdT negativos.

LLA-T o fenótipo T ocorre em 25% das LLAs do adulto e 15% dos casos na infância. Os estágios de maturação não têm importância prognóstica. São positivos para CD1, CD2, CD3 (citoplasmático ou superfície), e podem ser CD5⁺, CD7⁺ e TdT⁺. Podem ou não ser positivos para HLA-DR, CD34 ou CD10.

Leucemia bifenotípica

Este conceito tem evoluído muito, pois cada vez mais se tem demonstrado que a maioria dos marcadores monoclonais, especialmente os epítomos CD, embora estejam mais associados a determinadas linhagens, têm uma especificidade variável. Por outro lado, tem-se conseguido "purificar" cada vez mais as subpopulações de blastos leucêmicos à citometria de fluxo, separando-as dos linfócitos. Para este fim, são especialmente úteis as técnicas que separam os diversos tipos de células da medula usando-se o CD45 e o "side-scatter" (2,12,13). Num estudo revisando 746 casos de leucemia aguda, Hanson et al (14) encontraram 7% de leucemias que co-expressaram marcadores linfóides e mielóides. Como marcadores mais específicos de linhagem foram considerados a MPO (mielóide) o CD3 (T) e o CD22 (B) todos citoplasmáticos. Na leucemia bifenotípica é muito comum se encontrar marcadores de imaturidade como CD34, HLA-DR e CD34.

Leucemia aguda indiferenciada

Cerca de 1% dos casos de leucemia aguda são positivos para HLA-DR e CD34, mas não expressam marcadores linfóides ou mielóides.

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

A síndrome linfoproliferativa (SLP) são caracterizadas por leucocitose com aumento dos "linfócitos" (células linfóides anormais) no sangue periférico. Esta leucocitose pode ocorrer isolada, ou estar acompanhada de um quadro clínico de linfonodomegalia e/ou esplenomegalia. As SLP compreendem a leucemia linfóide crônica (LLC), que é o quadro mais freqüente e que está incluído na classificação de Kiel e na REAL dos linfomas. Mas há ainda as formas variantes da LLC, e o processo de leucemização dos linfomas indolentes. Este processo é definido como a passagem para a circulação sangüínea das células que compõe o linfoma. É uma ocorrência muito freqüente nos linfomas indolentes. O diagnóstico pode ser feito tanto pelo sangue periférico, quanto pela biópsia de linfonodo ou na peça cirúrgica de esplenectomia.

Há situações, porém, em que o paciente não apresenta linfonodomegalia periférica, ou a esplenectomia não está indicada. Nestes casos, a análise das células linfóides anormais, de caráter clonal, é fundamental para o diagnóstico. Assim como na LLA, a morfologia ajuda pouco no diagnóstico diferencial entre as diversas entidades. Ele é feito pela imunofenotipagem. Como se trata sempre de sangue periférico, a técnica preferencialmente usada é a análise na citometria de fluxo que permite quantificar a expressão dos antígenos. Pode-se também realizar a imuno-citoquímica em preparações de citocentrífuga. Este material, porém é inadequado, especialmente quando o número de leucócitos circulantes não é muito alto. Na técnica imuno-citoquímica não podemos separar sub-populações linfocitárias, nem analisar co-expressões (por exemplo: os fenótipos CD20/CD5, CD3/CD4 e CD3/CD8) fundamentais para o diagnóstico. Não se pode esquecer, que a fixação pode destruir alguns antígenos (15).

O estudo em lâmina só é formalmente indicado em duas situações: na leucemia de células plasmáticas e quando não se consegue demonstrar clonalidade devido à absorção inespecífica de imunoglobulinas na superfície das células neoplásicas (15).

Do ponto de vista da célula de origem, a maior parte das SLP são B. Os principais marcadores das entidades mais frequentes estão nas tabelas 3 e 4. Numa revisão de 547 pacientes Garand e Robillard ⁽¹⁶⁾ mostraram que, comparando-se o diagnóstico citológico com o imunofenótipo, algumas entidades apresentam alta concordância e outras não. A concordância mais alta é atingida na LLC-B e no imunocitoma, seguidos pelo linfoma de células do manto e a tricoleucemia. Nos outros casos, a concordância está abaixo de 60%. A menor concordância foi vista por estes autores na leucemia prolinfocítica e na assim chamada LLC do tipo misto (células pequenas e médias). A concordância nos linfomas foliculares também é ruim. Os principais diagnósticos diferenciais de importância clínica ocorrem entre linfoma de células do manto com LLC ou leucemia prolinfocítica. Esta última pode ter um imunofenótipo muito semelhante. São entidades resistentes às abordagens quimioterápicas conhecidas e de mau prognóstico.

Para uma abordagem prática na rotina, um painel de anticorpos deve conter pelo menos um marcador pan-B (CD19, CD20 ou CD22) e um marcador pan-T (CD2 ou CD3) para diferenciar os 2 grandes grupos. Nas SLP-T ainda será importante verificar se as células são de caráter "helper" (CD4), "supressor" (CD8) ou NK (CD16/CD56). Se a SLP é B, os anticorpos mais importantes para os diversos diagnósticos diferenciais serão o CD23 (para separar a LLC-B de todas as outras), o CD5 (positivo só na LLC e no LCM), o CD10 (que separa o linfoma folicular) e a expressão clonal das imunoglobulinas de superfície. Nos casos de suspeita de tricoleucemia, o anticorpo mais específico é o CD103, se fizermos o diagnóstico em sangue periférico. Mas este diagnóstico, muitas vezes, é mais fácil de ser realizado em biópsia de medula, onde se consegue evidenciar maior número de células neoplásicas.

Tabela 1 - Classificação FAB para leucemia mielóide aguda	
Subtipo	definição
M0	< 3% de blastos Sudan B/ Px positivos Na imunofenotipagem, positividade para MPO ou CD33
M1	>3% de blastos Sudan B/ Px positivos < 10% de elementos mielóides mais maduros
M2	blastos positivos para Sudan B/ Px > 10% de elementos mielóides mais maduros < 20% de células monocíticas (esterase positivas)
M3*	Promielócitos hipergranulares* todas as células Sudan B/Px positivas, feixes de bastonetes de Auer
M4	Blastos, monoblastos, formas mais maduras > 20% de blastos Sudan B/ Px positivas > 20% de células esterase positivas existe a forma com aumento dos eosinófilos
M5	< 20% de blastos Sudan B/ Px positivos > 80% de células esterase positivas M5a blastos / M5b promonócitos
M6	blastos não eritróides são > 30% > 50% eritroblastos > 30% dos blastos com características morfológicas e com marcadores megacariocíticos
M7	> 30% de blastos: mieloblastos e megacarioblastos** megacarioblastos > 30%
Px mieloperoxidase * ver subtipos de M3 no texto ** micromegacariócitos não são contados como blastos	

Tabela 2 - Roteiro diagnóstico de leucemias agudas baseada nas normas preconizadas pelo International Council for Standardization in Haematology (1)	
Morfologia	FAB-M2 e M4, FAB-M3, FAB-M6, FAB-L3 blastos sem diferenciação
Citoquímica	Sudan B/Px positivo LMA esterase FAB-M4 ou M5 citoquímica negativa → indefinido → fazer imunofenotipagem
Imunofenotipagem (painel mínimo em lâmina)	MPO LMA inclusive FAB-MO cCD3 LLA de origem T cCD22 LLA de origem B inconclusivo → prosseguir na imunofenotipagem em citometria de fluxo, ampliando o painel

	LLC-B	LPL-B	IC	LCM	FCC	LZM**	HCL	LCV
pan-B*	+	+	+	+	+	+	+	+
CD22	-	+	+	+	+	+	+	+
CD23	+	-		-	-/+	-	-	-/+
CD10	-	-	-	-	+	-	-	-/+
CD5	+	-	-	+	-	-	-	-
CD11c	-/+	-/+	-/+	-	-	-/+	±	-/+
CD25	-/+	-/+	-/+	-	-/+	-	+	-
SIg	fraco	forte	***	moderado	forte	moderado	moderado	forte
CD103	-	-	-	-	-	-	+	-

* CD19 ou CD20

** os linfomas MALT tem o mesmo imunofenótipo

*** imunoglobulina intracitoplasmática fortemente positiva

IC=linfoma linfoplasmocitoide ou imunocitoma

LCM=linfoma de células do manto

FCC=linfoma de centro folicular (CB/CC)

LZM=linfoma de zona marginal

HCL=tricoleucemia

LCV=linfoma de células vilosas

	LLC-T	LPL-T	LPT	micose fungoide/ Sézary	ATLL	LNH com grânulos grandes
CD2	+	+	+	+	+	+
CD3	+	+	+	+	+	-
CD5	+	+	-/+	+	+	+
CD4	+	+	-/+	+	+*	-
CD8	-	-/+	-/+	-	- (raros +)	+
CD16/CD56	-	-	-	-	-	+

* na maioria dos casos

CD7 funciona como um anticorpo pan-T adicional e não acrescenta informações diagnósticas

LLC-T=leucemia linfóide crônica T

LPL-T=leucemia prolinfocítica T

LPT=linfoma T periférico

ATLL=linfoma/leucemia T do adulto

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scott CS et al. (International Council for Standardization in Haematology). Recommended procedures for the classification of acute leukemias. *Leuk & Lymphoma* 1995; 18 (suppl 1): 1-12.
2. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-2892.
3. Cheson RD et al. Report of the National Cancer Institute-Sponsored Workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1990; 8: 813-819.
4. Bennett JM et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103: 626-629.
5. Rothe G et al. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996; 10: 877-895.
6. Matutes E. Contribution of immunophenotype in the diagnosis and classification of hemopoietic malignancies. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 194-197.
7. Bcs H. General Haematology Task Force. Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukemia. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 777-781.
8. Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, Castoldi G. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysosyme in normal and leukemic cells. *Cytometry* 1997; 30: 134-144.
9. Lorand-Metze I, Oliveira GB, Ozelo MC. Megakaryopoiesis in myelodysplastic syndromes: morphological and immunocytochemical features. *Leuk. Res.* 1997; 21 (suppl 1): 522.
10. Betz SA, Foucar K, Head DR, Chen IM, Wilman CL. False-positive flow cytometric platelet glycoprotein IIb/IIIa expression in myeloid leukemias secondary to platelet adherence to blasts. *Blood* 1992; 79: 2399.
11. Neame PB et al. Morphology of acute promyelocytic leukemia with cytogenetic or molecular evidence for the diagnosis: characterization of additional microgranular variants. *Am. J. Hematol.* 1997; 56: 131-142.
12. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; 100: 534-540.
13. Lacombe F et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1878-1886.
14. Hanson CA, Abaza M, Sheldon S, Ross CW, Schnitzer B, STOOLMAN LM. Acute biphenotypic leukaemia: immunophenotypic and cytogenetic analysis. *Brit. J. Haematol.* 1993; 84: 49-60.
15. Bcs H. General Haematology Task Force. Immunophenotyping in the diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 871-875.
16. Garand R, Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol. Cell. Ther.* 1996; 38: 471-486.

17. MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Evandro Sobroza de Mello e Venâncio A. F. Alves

Os patologistas cirúrgicos, em geral, tendem a ser empíricos. Este empirismo consiste tanto na sua dificuldade em utilizar métodos que exijam um consumo maior de tempo para a obtenção de resultados mais objetivos, quanto no seu hábito por emitir impressões subjetivas sobre os mais variados temas. Em relação à proliferação celular, acredita-se que quanto maior a atividade proliferativa de um tumor, pior será seu comportamento biológico. Como conseqüência, muito esforço tem sido feito no desenvolvimento de métodos objetivos para avaliar a proliferação celular e estudar o significado destes métodos (mais do que da atividade proliferativa em si) no estudo das neoplasias, especialmente no seu prognóstico.

Na verdade, estudar a dinâmica celular é vital para a compreensão de uma grande variedade de processos fisiológicos ou patológicos. Os métodos imuno-histoquímicos, cada vez mais difundidos entre os laboratórios de patologia e com melhores resultados à medida que as técnicas vão se aprimorando, já se encontram entre os mais úteis e mais comumente usados para avaliação da proliferação. Para a compreensão adequada destes métodos, é necessário um conhecimento mínimo dos processos que ocorrem durante o ciclo celular e da forma como outros métodos usados para avaliação da proliferação se encaixam nestes processos.

O CICLO CELULAR

A mitose e a citocinese, por constituírem um espetáculo facilmente apreciável ao microscópio ótico, foram por muito tempo o principal foco de atenção dentro do ciclo celular, apesar de constituírem em conjunto um período muito breve, chamado de fase M⁽¹⁾. O intervalo entre duas mitoses, chamado interfase, tem uma duração muito maior, só que parece inteiramente homogêneo ao microscópio ótico. Já quando observada sob outras técnicas, a interfase pode ser compreendida como uma série de eventos preparatórios para a divisão celular, que ocorrem de forma ordenada e sujeitos a uma gama de mecanismos de regulação. A interfase divide-se em **fase G1**, período em

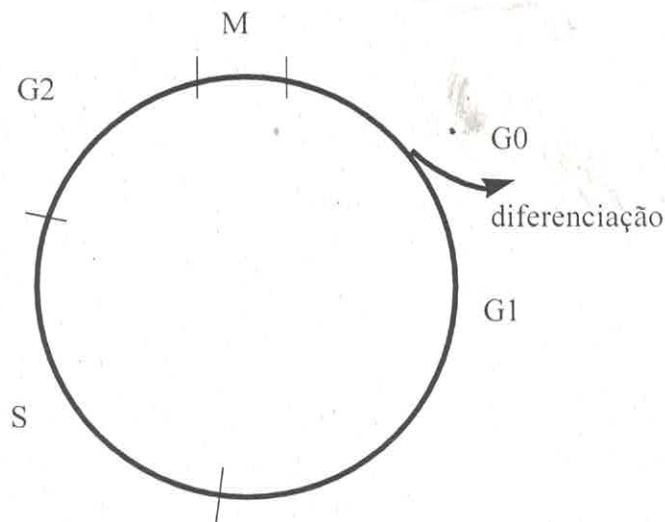


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo celular

que a célula está se preparando para o início da síntese de DNA, caracterizado por pronunciada síntese de RNA, **fase S**, onde há a síntese de DNA propriamente dita, e **fase G2**, entre o final da fase S e o início da mitose, onde a célula apresenta conteúdo duplicado de material genético. Ainda temos as células na fase G0, ditas quiescentes, usualmente encarregadas de executar a função do tecido em questão, e que estão fora do ciclo celular propriamente dito. O ciclo celular está representado na figura 1.

Durante o ciclo celular, as células têm três caminhos possíveis a percorrer²: permanecer no ciclo, e portanto seguir para uma próxima divisão, permanecer viva sem divisões adicionais (usualmente entrando em G0 ou sofrendo diferenciação), ou morrer por apoptose. As decisões sobre que caminho tomar acontecem em dois pontos cardinais, chamados de "checkpoints": o ponto onde há comprometimento com a replicação do DNA, chamado **ponto de restrição**, e aquele onde há comprometimento com a divisão mitótica no final de G2. Durante a fase G1, fatores de crescimento determinam a ativação de uma série de genes que resultará na proliferação ou diferenciação celular. Uma vez iniciada a fase S, os fatores de crescimento não exercem mais nenhuma influência, e a célula progredirá através do ciclo celular governada unicamente por fatores intrínsecos.

Existem muitos métodos para avaliação da proliferação celular, executados com bases imuno-histoquímicas ou não. Faremos um breve comentário sobre os principais métodos não imuno-histoquímicos, pois é principalmente através da comparação com estes métodos já há muito estabelecidos que o conhecimento dos antígenos para o qual dirigimos nossos anticorpos tem se desenvolvido. Posteriormente, passaremos a uma discussão mais aprofundada sobre os marcadores imuno-histoquímicos. Esta discussão se detém em grande parte no esclarecimento dos fundamentos biológicos destes marcadores, uma vez que sua utilização está ainda concentrada na atividade de pesquisa. Características técnicas e aspectos metodológicos para sua interpretação também serão abordados, uma vez que freqüentemente são responsáveis pela variação de resultados entre os estudos. As suas aplicações num serviço de diagnóstico

anatomopatológico ainda são limitadas. Entre as mais importantes estão a avaliação prognóstica do carcinoma de mama e dos linfomas, apresentadas nos capítulos específicos.

PRINCIPAIS MÉTODOS NÃO IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Contagem de mitoses - Este é o método tradicional, e seguramente o mais usado, de avaliar a proliferação celular. Sua principal vantagem está na ausência de necessidade de outros preparados além de uma secção histológica corada pela hematoxilina-eosina. Os principais fatores contra o uso da contagem de mitoses são técnicos e de interpretação. Dentre os fatores técnicos, além da necessidade óbvia de preparados histológicos de boa qualidade, está a possibilidade de que o retardo no início do processo de fixação pode causar um decréscimo no resultado da contagem, resultante da continuação e término do processo mitótico³. Na verdade, mais recentemente foi demonstrado que o número de mitoses só parece diminuir de forma significativa em tumores com índices mitóticos muito altos, onde o decréscimo não é suficiente para alterar o significado da contagem⁽⁴⁾. Nos tumores com contagem mitótica menor este decréscimo é mínimo, e portanto sem maior importância a não ser naqueles casos em que a contagem é limiar. Resultados decrescentes na contagem parecem ocorrer principalmente da crescente dificuldade no reconhecimento das mitoses à medida que aumenta o tempo de retardo de fixação, e não por causa da conclusão do processo mitótico. O outro fator decisivo é a capacidade do patologista para distinguir uma verdadeira mitose, que poderia afetar a reproducibilidade do método. Quando critérios bem estabelecidos são usados, no entanto, a reproducibilidade do método é bastante elevada⁽⁵⁾. As recomendações gerais para contagem de mitoses incluem: a) avaliação dentro da área de maior atividade mitótica, onde a escolha dos campos de grande aumento deve ser aleatória (deve-se evitar a seleção, dentro desta área de maior atividade mitótica, apenas daqueles campos com maior número de mitoses), b) quatro contagens de 10 campos seriam efetuadas, sendo considerada aquela com o maior resultado⁽⁶⁾, c) seriam contadas apenas mitoses morfológicamente bem estabelecidas.

Marcação pela timidina tritiada (T [H₃]) - este é um outro método clássico de avaliação da proliferação celular, onde um análogo radioativo da timina é fornecido para uma cultura de células ou inoculado em animal vivo, é incorporado pelas células em fase S e posteriormente é visualizado através da autorradiografia⁽⁷⁾. O contingente de células que incorpora a T[H₃] reflete a fração de fase S daquela população celular. A avaliação de amostras posteriores desta população pode também nos fornecer o número de ciclos através do qual cada célula passou em determinada faixa de tempo, pois em cada ciclo o número de pontos de marcação por núcleo divide-se pela metade. Apesar de ser um método bastante interessante, tem a óbvia desvantagem de ter que ser usado em células vivas, o que na prática lhe atribui severas limitações. Um análogo da T[H₃] é a marcação com bromodeoxiuridina, que usa os mesmos princípios e que, após o processo de incorporação, pode ser revelada por métodos imuno-histoquímicos. Tanto a T[H₃] quanto a bromodeoxiuridina, por serem métodos muito bem estabelecidos, são usados como parâmetro de comparação na avaliação dos métodos imuno-histoquímicos, como veremos a seguir.

Marcação pela prata das regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) - As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são alças de DNA que transcrevem o RNA ribossomal. Estão localizadas em duplas em cada um dos cinco pares de cromossomas acrocêntricos, totalizando 20 NORs por célula diplóide. Em 1975, descobriu-se que as NORs poderiam ser demonstradas através de um método de impregnação pela prata, devido a argirofilia das proteínas a elas associadas. Grande impacto teve a modificação da técnica aplicada onze anos depois em material parafinado⁽⁸⁾. O que se mede por este método é o grau de dispersão das NORs, que reflete a atividade proliferativa de uma população celular. Tem sido proposto que o resultado da avaliação das AgNORs pode refletir a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular⁽⁹⁾. Tal conceito indica que o uso das Ag NORs tem um valor adicional podendo ser associado aos demais métodos que avaliam a fração de crescimento, para termos uma visão mais precisa da atividade proliferativa do tumor.

Citometria de Fluxo - A citometria de fluxo é uma técnica automatizada que permite a quantificação do conteúdo de DNA celular e a análise da distribuição das células dentro do ciclo celular. Uma suspensão celular, que pode ser preparada de tecido a fresco ou parafinado, é corada com fluorocromos DNA-específicos, e então é disposta em fluxo através de um feixe de luz. Detectores de fluorescência, capazes de detectar a luz emitida por milhares de células a cada segundo, convertem-na em um sinal eletrônico que é analisado por um sistema computadorizado. O resultado final é um histograma de DNA. Então, de acordo com o conteúdo de DNA (conhecido como ploidia), pode-se determinar as células que estão em fase G0/G1 (diplóides), células em fase G2 (tetraplóides) e células em fase S (conteúdo intermediário de DNA). Pode-se ainda detectar populações celulares aneuplóides ou poliplóides. Através de fluorocromos que marquem o RNA, também é possível separar células em G0 de células em G1. A principal vantagem da citometria de fluxo está na enorme quantidade de células que podem ser avaliadas num curto espaço de tempo, a principal desvantagem está na impossibilidade de correlação direta com a morfologia, que pode tornar difícil a separação dos dados provenientes de células tumorais das outras células nativas do tecido (fibroblastos, linfócitos, etc) ou de relacionar-se os dados a uma população morfológicamente distinta do tumor. Os sistemas mais modernos, incluindo análise de múltiplos marcadores e de "filtros" segundo algumas características morfológicas das células aumenta consideravelmente o potencial deste método.

MÉTODOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Os métodos imuno-histoquímicos baseiam-se na detecção de antígenos cuja expressão tenha relação qualitativa ou quantitativa com uma ou mais fases do ciclo celular. Holfstädter e colaboradores² propõe o agrupamento destes antígenos em duas categorias: enzimas e cofatores que estão envolvidos na síntese de DNA durante a fase S do ciclo celular (onde enquadra-se o antígeno nuclear de proliferação celular, PCNA, mas também outros como a DNA polimerase alfa e a topoisomerase II alfa), e proteínas de função desconhecida (onde, entre outros, destaca-se o Ki-67). Neste capítulo, nós discutiremos os dois marcadores mais amplamente utilizados nos laboratórios de imuno-histoquímica: o Ki-67, que é o marcador que tem a maior consistência biológica, o PCNA,

ainda muito usado, apesar das inúmeras inconsistências biológicas e técnicas que o afligem.

Antígeno nuclear Ki-67 - Em 1983, Gerdes e colaboradores descreveram a preparação de um anticorpo monoclonal de camundongo, dirigido a um antígeno presente em células em proliferação, que foi chamado de Ki-67 ⁽¹⁰⁾. Este anticorpo foi obtido em estudos que tinham como objetivo a produção de anticorpos monoclonais para antígenos nucleares específicos das células de Hodgkin e Reed-Sternberg, através da imunização de camundongos com extrato nuclear da linhagem celular L428. Os produtos dos hibridomas que reagiam com núcleos das células neoplásicas do linfoma de Hodgkin foram retestados em secções de tecido congelado de um linfonodo parcialmente envolvido pela D. de Hodgkin. O anticorpo designado como Ki-67, além de reagir com núcleos de células de Hodgkin e de Reed-Sternberg, também o fez com muitos núcleos das células presentes em centros germinativos. Já a grande maioria das células linfóides presentes fora dos centros germinativos e outras células, como plasmócitos e fibroblastos, eram negativas para Ki-67. Como as células do centro germinativo são sabidamente células com uma alta taxa de proliferação, foi levantada a hipótese de que o antígeno identificado pelo Ki-67 estava relacionado à proliferação celular. Testou-se esta hipótese utilizando-se o Ki-67 em uma gama de tecidos humanos com padrão de proliferação conhecido. Os resultados foram altamente comparáveis com os obtidos nas duas décadas anteriores através de estudos de captação de timidina [H_3] nos mesmos tecidos. A relação do Ki-67 com a proliferação celular estava evidenciada.

Neste trabalho, a relação Ki-67/proliferação celular foi também demonstrada pela estimulação de culturas de células em repouso com fitohemaglutinina (PHA), através do que essas células se transformavam em células proliferantes e passavam a expressar Ki-67 em seus núcleos. Já quando induziam-se com TPA células proliferantes a diferenciarem-se, o antígeno desaparecia. Foram estudadas também algumas neoplasias, como a leucemia linfocítica crônica, que mostrou uma baixa taxa de marcação com Ki-67, e o linfoma de Burkitt, com marcação de 49-90% das células. Já neste momento ficou clara a relação do percentual de células marcadas com Ki-67 de cada uma destas neoplasias e a sua taxa de proliferação.

Estes experimentos iniciais ainda não esclareciam se o Ki-67 estava presente em apenas algumas ou em todas as fases do ciclo celular. No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores publicou um estudo detalhado da expressão do Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular ⁽¹¹⁾. Para tanto, foram usados **métodos indiretos** [mais especificamente a relação temporal entre a síntese de RNA, DNA e proteínas - que apresentam padrões conhecidos nas diferentes fases do ciclo celular - e a expressão do antígeno Ki-67 em culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico (LSP) estimulados por PHA, e **métodos diretos** (dupla marcação de LSP estimulados pela PHA para Ki-67 e incorporação da T [H_3], ou por separação de células em diferentes fases do ciclo celular pelo método de citometria de fluxo FACS, seguida pela imunocoloração das células separadas com Ki-67).

Considerando a cultura de LSP, a incorporação de leucina [H_3] (evidência de síntese de proteínas) e uridina [H_3] (evidência de síntese de RNA) iniciavam imediatamente após o estímulo com PHA, mas a incorporação de T [H_3] e a expressão de Ki-67 começavam quase simultaneamente apenas 24 h após o estímulo. Quando se

faz a marcação dupla com T[H₃] e Ki-67, observa-se que após 60 horas do estímulo com PHA a maior parte das células incorporaram T [H₃] e estão marcadas pelo Ki-67, uma pequena proporção de células (9,9 %) apresentam apenas marcação com Ki-67 - provavelmente representando células em fase G₁, e uma proporção mínima (1,3%) apresentam marcação apenas com T [H₃] - presumivelmente células que ciclaram, passando pela fase de síntese e incorporando T [H₃], mas que estavam novamente em Go no momento da marcação com Ki-67, 60 horas após o estímulo com PHA.

Usando FACS para separar as células (PBL, controles e estimuladas por PHA) nas diferentes fases do ciclo celular, de acordo com o seu conteúdo de DNA e RNA, ficou evidente que as células controle de culturas não estimuladas tinham apenas perfil característico de fase Go, e estas células eram negativas para Ki-67. Quando células de culturas estimuladas por PHA eram avaliadas, 85-98% das células S e G₂+M expressavam antígeno Ki-67. A proporção de células Ki-67 positivas dentro da fração G₁ aumentou consideravelmente com o passar do tempo após a estimulação por PHA (menos de 1% após 24h, 30% com 36 h e até 92% com 65 h). O antígeno nuclear Ki-67 também estava presente em todas as células em mitose.

Células em transição de Go a G₁ são referidas como G₁T. De acordo com o conteúdo de DNA das células, G₁ é dividida em G₁A e G₁B. Células passando os eventos mais precoces após a estimulação por PHA (células em G₁T e G₁A) foram constantemente negativas para Ki-67. As células G₁ recém saídas de Go se tornam positivas para Ki-67 na fase G₁B. Por outro lado, as células G₁ preparadas de culturas ciclantes (de células que acabaram de sair da mitose) foram constantemente Ki-67 positivas: aí parece haver uma nítida diferença entre as células em G₁ provenientes de mitose e as provenientes de Go.

Mas o que é o antígeno nuclear marcado pelo Ki-67 ? Em 1988 e 1989, Verheijen e colaboradores publicaram suas observações sobre a localização do antígeno Ki-67, primeiramente no núcleo em interfase ⁽¹²⁾ e depois no núcleo em mitose ⁽¹³⁾, utilizando imunofluorescência, microscopia confocal e imunoeletromicroscopia.

No **núcleo em interfase**, o Ki-67 reage com um antígeno localizado principalmente no nucléolo. Foram estudadas células humanas MR65 (células de carcinoma de pulmão com núcleos grandes e que crescem em mono-camada na cultura), onde a microscopia confocal e a imunoeletromicroscopia revelou que este antígeno está predominantemente localizado no córtex nucleolar e nos componentes fibrilares densos. Além disso, o antígeno Ki-67 parece estar preservado na matriz nuclear de preparações obtidas depois do fracionamento in situ de células MR65 em interfase.

No **núcleo em mitose**, o nucléolo gradualmente se desintegra e acaba desaparecendo quando os cromossomas se condensam. Usando-se imunofluorescência com Ki-67, os seguintes padrões foram identificados nas diferentes fases da mitose: na prófase, antes que a condensação cromossômica tenha se completado, o padrão nuclear do Ki-67 transforma-se em uma rede através do nucleoplasma, aparentemente associada à cromatina, na metáfase, um retículo de fibrilas fluorescentes interconectadas foi observado, alterando-se para um padrão mais granular durante a anáfase e telófase, durante a telófase tardia, quando o nucléolo está voltando a se formar, o Ki-67 apresentou um padrão pontilhado, que seguiu-se por uma agregação destes pontos, finalmente restaurando o padrão nucleolar típico da interfase nas células filhas.

A microscopia confocal forneceu maiores detalhes sobre a distribuição espacial do antígeno Ki-67 durante a mitose, sendo possível observar-se que o padrão de fluorescência fornecido pelo Ki-67 formava uma intrincada rede ao redor do material cromossômico condensado. A imunoeletrônica mostrava claramente esta relação do Ki-67 com a cromatina, pois a reação acontecia de forma predominante ao redor da cromatina condensada (que nesta técnica pode ser observada simultaneamente com a reação imuno-histoquímica).

Ainda dentro deste trabalho, procedimentos de extração seletiva *in situ* foram aplicados às células MR65. Mesmo após o tratamento com RNAses, DNAses, detergentes e soluções hipertônicas (o que resulta no então chamado "nuclear matrix-intermediate filament scaffolds"), a imunofluorescência para Ki-67 ainda revelava a típica reação nucleolar em células na interfase e padrão reticular na célula em mitose. Também foi demonstrado que as histonas haviam sido removidas neste processo. Estes resultados sugerem que a distribuição do Ki-67 não é dependente da presença de DNA ou de histonas, o que indica que o antígeno é associado com uma estrutura proteica não histônica conhecida como "scaffold" cromossômico ou é parte integral dela.

A caracterização biológica do antígeno Ki-67 começou a tomar consistência com uma nova publicação de Gerdes e colaboradores, em 1991 ⁽¹⁴⁾. Além de confirmar que o antígeno trata-se de uma proteína não histônica (através da constatação de que não podia ser extraído pelo tratamento com HCL 0,1 N) com o uso diferentes enzimas, foi demonstrada sua alta suscetibilidade ao tratamento com proteases. Esta última aparentemente foi a responsável pelo insucesso dos estudos por imunoblot anteriores. Usando métodos imunoblot onde o tempo de preparação dos lisados era encurtado (para minimizar o problema da suscetibilidade à proteólise), estes autores obtiveram sucesso em caracterizar o antígeno Ki-67 como um complexo bimolecular com peso molecular de 345 e 395 kd. O gene que codifica o antígeno Ki-67 também foi clonado e sequenciado ⁽¹⁵⁾ localizando-o no cromossomo 10 (10q25).

Em 1992, na seção intitulada "Rapid Communication" do periódico *Journal of Pathology*, foi publicado o avanço que provavelmente foi o mais importante em tornar a avaliação do Ki-67 a principal arma de avaliação da proliferação celular em neoplasias ⁽¹⁶⁾. Foi então descrita a produção de dois novos anticorpos (MIB 1 e MIB 3) que eram capazes de detectar a expressão da proteína Ki-67 em material embebido em parafina. Nos primeiros testes, esses marcadores só eram capazes de marcar células em mitose no material parafinado, e desta forma teriam pouco a acrescentar. No entanto, quando o então recentemente descrito método de recuperação de epítomos no forno de microondas foi utilizado, o padrão de reação do MIB 1 e do MIB 3 se tornava similar ao que se obtinha com o anticorpo Ki-67 em material congelado. Isto tornava possível a avaliação da fração de crescimento em material de arquivo, mesmo quando em blocos de parafina estocados por muitos anos. Na verdade, a forma de produção destes dois anticorpos, usando como imunógenos proteínas recombinantes obtidas pela expressão bacteriana de partes do DNA do Ki-67, só foi publicada um ano mais tarde ⁽¹⁷⁾.

Uma vantagem adicional do Ki-67 como marcador de células em proliferação é a sua meia-vida curta, com o antígeno sendo degradado uma hora ou menos após a mitose ⁽¹⁸⁾. Isso garante que células que já tenham saído do ciclo celular não apresentem o antígeno. O fato das células em fase G1 precoce, que acabaram de sair de G0, não apresentarem o antígeno faz com que freqüentemente se argumente que a marcação do

Ki-67 levaria a alguma subestimação da fração de crescimento de um tecido, outros, no entanto, têm demonstrado justamente o contrário ⁽¹⁹⁾.

De qualquer forma, tendo em vista todos estes dados, nos parece claro que a marcação do Ki-67 resulta numa avaliação bastante aproximada da fração de crescimento de uma população celular. Marcação mesmo que tênue pode ser considerada positiva, ou seja, a célula mesmo minimamente marcada encontra-se dentro do ciclo celular. Em adição, tem-se disponível um anticorpo monoclonal, o MIB-1, que apresenta resultados homogêneos e de fácil interpretação em material parafinado.

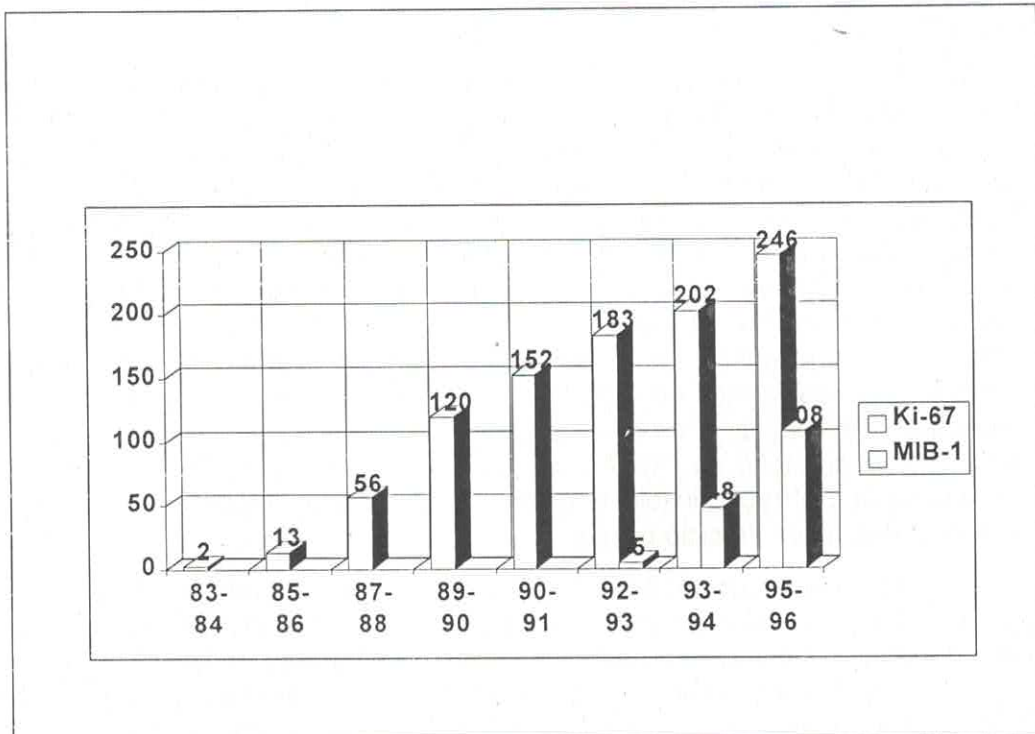


Figura 2 - Ki-67/MIB1 - Número de publicações por período, a partir de 1983 (fonte: Medline)

Portanto, acreditamos que o Ki-67, na forma do MIB-1, é o melhor marcador operacional da proliferação celular para o patologista cirúrgico. A importância crescente do Ki-67 na literatura está bem demonstrada na figura 2.

Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) - Historicamente, o PCNA foi descrito como um auto-anticorpo presente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, que identificava um antígeno presente nas células em proliferação ^{20,21}. Este antígeno foi posteriormente identificado como PCNA, uma proteína nuclear não histônica de 36 KD, envolvida na síntese do DNA ²². Como uma proteína auxiliar das polimerases delta e epsilon, o PCNA é necessário para a replicação do DNA in vivo e in vitro, e pelo menos in vitro também é necessário no processo de reparo do DNA ⁽²³⁾.

O PCNA é uma proteína altamente conservada, com homologia na sequência de amino-ácidos entre os mamíferos ⁽²⁴⁾, e cujo gene está presente tanto em mamíferos como em plantas superiores ⁽²⁵⁾.

Há algum tempo que o PCNA tem sido empregado, e largamente, como um marcador operacional de proliferação celular, situação que acentuou-se com o desenvolvimento de anticorpos que funcionam em material fixado em formol e embebido em parafina ⁽²⁶⁾. Os dados iniciais usando tecido normal apresentavam resultados em que havia marcação das células dos compartimentos sabidamente proliferativos. No estudo de tumores, no entanto, alguns têm encontrado uma boa correlação com outros parâmetros de medida da proliferação celular, como o próprio Ki-67 ⁽²⁷⁾, e outros, paradoxalmente, não ⁽²⁸⁾.

Apesar de poder ser usado com recuperação de epítomos pelo calor (microondas ou panela de pressão), o anticorpo monoclonal PC10 dirigido ao PCNA mais comumente é usado sem este procedimento. O padrão de reação então parece ser fortemente influenciado pela fixação do tecido - longos períodos de fixação em formalina diminuem significativamente o percentual de células marcadas ⁽²⁹⁾. O tipo de fixador também influencia os resultados. - fixação em solventes orgânicos como o methacarn deixa marcação apenas de células em fase S (com um padrão granular), enquanto fixadores aldeídicos, como a formalina, permitem a marcação de células em todas as fases do ciclo celular (padrão nucleoplásmico, usualmente intenso). Esta diferença tem sido explicada pela existência de duas formas de PCNA: uma forma solúvel em solventes orgânicos e não envolvida em replicação, e uma forma insolúvel associada com os sítios de síntese do DNA ⁽³⁰⁾. A concentração do PCNA total varia apenas em 2-3 vezes durante o ciclo celular, enquanto que a fração insolúvel existe em quantidade bem maior durante a fase S do que nas outras fases do ciclo celular.

Alguns aspectos biológicos complicam ainda mais a interpretação de reações para o PCNA - há superexpressão em alguns tipos de tumores malignos, não relacionada às fases do ciclo celular, células normais adjacentes a neoplasias e fora do ciclo celular, podem também apresentar expressão do antígeno ⁽³¹⁾. Um outro fator bem conhecido, e em desvantagem com relação ao Ki-67, é a meia vida muito longa do PCNA - cerca de 20h, que permite que células que há muito já deixaram o ciclo celular ainda persistam apresentando o antígeno ⁽¹⁹⁾, resultando numa proporção de positividade imuno-histoquímica maior do que a esperada quando avaliamos outros marcadores de proliferação celular.

Como resultado de todos estes aspectos, o padrão da reação imuno-histoquímica para o PCNA é o seguinte: a) quando o tecido é fixado em formalina, podemos ter positividade virtualmente em todas as células, apenas com uma intensidade maior nas células que estiverem em fase S - usualmente é necessário estabelecer um "cut-off" de intensidade de reação a partir da qual consideraremos os núcleos positivos (existem núcleos desde fracamente até fortemente marcados - a partir de qual intensidade a reação será considerada positiva?), e a avaliação com um analisador de imagem pode ser indispensável para que tenhamos resultados reproduzíveis ao longo da rotina de um mesmo serviço, b) quando temos fixação em solventes orgânicos, o que é muito pouco freqüente, então temos evidências de que a reação é em grande parte limitada aos núcleos em fase S, o que facilitaria a interpretação dos resultados, c) expressões anômalas não associadas ao ciclo celular são imprevisíveis no caso isolado. De qualquer

forma, o PCNA aparece em todas as fases do ciclo celular - o que realmente varia é sua quantidade ao longo do ciclo, e isso dificulta muito a sua interpretação.

ASPECTOS TÉCNICOS E METODOLÓGICOS NA AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Tanto o Ki-67 quanto o PCNA são marcadores nucleares, e apenas a positividade nuclear deve ser considerada. No caso do Ki-67, muitas vezes o nucléolo está mais intensamente corado do que o restante do núcleo - já observamos alguns poucos casos com positividade quase exclusivamente nucleolar, que também é específica. Raramente pode aparecer positividade de membrana celular, que acreditamos deva ser descartada. No caso do Ki-67, mesmo positivities tênues devem ser consideradas. Temos visto alguns tumores, especialmente de linhagem mesenquimal, que têm apenas núcleos fracamente corados. Já com o PCNA é diferente: usualmente é necessário o estabelecimento de um "cut-off" de intensidade de reação acima do qual o núcleo será considerado positivo - para obter-se uma reprodutibilidade satisfatória, análise de imagem computadorizada pode ser necessária.

A fixação excessiva em formalina altera a reatividade para o PCNA, resultando em contagens menores quanto maior o período de fixação ⁽³¹⁾. Já o retardo no início da fixação parece não alterar de forma significativa os resultados da reação ⁽³²⁾. Isto está de acordo com os dados obtidos sobre a distribuição das células no ciclo celular, onde foi observado apenas um pequeno aumento na fração G2/M após um retardo de 12h no início da fixação ⁽⁴⁾.

Em relação ao Ki-67/MIB-1, nós temos observado constância dos resultados mesmo quando tempos tão longos quanto 10 dias de fixação em formalina são aplicados ⁽³³⁾. Já em relação ao retardo no início da fixação, não conhecemos dados pertinentes ao Ki-67 na literatura.

Um outro aspecto importante e que favorece o uso do Ki-67/MIB-1 é a influência da diluição dos anticorpos nos resultados da marcação imuno-histoquímica. Já foi bem demonstrado que o número de células coradas com o PCNA/PC10 diminuem à medida que a diluição aumenta, sem nenhum platô identificável. Já com o Ki-67/MIB-1, grandes variações na diluição produzem resultados similares uns aos outros ⁽³⁴⁾. É provável que isso reflita a diferença de meia-vida entre estas duas proteínas, estando diretamente relacionado às quantidades pequenas, mas detectáveis, de PCNA no núcleo de células não ciclantes.

O aspecto metodológico da avaliação destes marcadores também nos parece muito importante. A forma com que eles são avaliados nas publicações científicas é bastante variada, mas usualmente predominam os métodos quantitativos, onde os núcleos são contados visualmente ou através de sistemas computadorizados de análise de imagem. Muitos laboratórios já estão usando a avaliação do Ki-67 na rotina, especialmente nas baterias prognósticas para carcinoma da mama. Em contraste com as publicações científicas, o método mais freqüentemente utilizado nesta situação é a semi-quantificação, feita através de uma estimativa aproximada da proporção de núcleos positivos. Recentemente nós fizemos estudos comparativos entre os métodos de contagem e estimativa (semi-quantificação) para o Ki-67/MIB1, tanto em carcinomas de mama quanto em lesões escamosas invasoras e pré-invasoras do colo uterino ^(35,36).

Estabelecemos, para a semi-quantificação, faixas de positividade (<10% dos núcleos, entre 10-25%, entre 25-50%, >50%) dentre as mais freqüentemente usadas na literatura. Obtivemos resultados similares pelos dois métodos, e acreditamos que a semi-quantificação, por dar resultados semelhantes à contagem e por consumir um tempo muito menor, é suficiente para fins práticos. Nós temos adotado a semi-quantificação na rotina. Para isso, no entanto, acreditamos que cada laboratório deve fazer um pequeno estudo comparativo interno para "calibrar" a capacidade de semi-quantificação de sua equipe.

O "cut-off" a partir do qual um tumor é considerado como altamente proliferativo também é muito variável. No caso do carcinoma de mama, usualmente quando o tumor tem menos do que 10% dos núcleos marcados para Ki-67/MIB-1, é considerado como tendo uma baixo índice de proliferação, mais do que 25%, um alto índice. Valores entre 10-25% poderiam ser considerados como moderados.

A heterogeneidade observada dentro de um tumor quanto ao seu índice de proliferação, usando-se os mais diferentes métodos, é um fato bem conhecido⁷. No caso do carcinoma de mama alguns resultados são contundentes: mais do que 1/3 dos casos, quando estudados pelo Ki-67/MIB-1, têm uma heterogeneidade suficiente para serem considerados de alto grau em uma área e de baixo grau em outra, quando o tumor foi avaliado em quatro secções diferentes⁽³⁷⁾. Um índice maior de marcação para Ki-67/MIB-1 é encontrado na periferia do que no centro dos carcinomas de mama⁽³⁸⁾. Os valores da periferia refletem melhor o prognóstico do tumor^(38,39), o que talvez indique que a área mais proliferativa ("hot spot") tem um maior impacto do que uma simples avaliação genérica do índice de proliferação.

COMENTÁRIOS FINAIS:

A atividade proliferativa de um tumor é o resultado de sua fração de crescimento e também da velocidade com que o tumor completa o ciclo celular (tempo de geração). O Ki-67 marca de forma muito aproximada a fração de crescimento de uma população de células, enquanto outras formas de avaliação nos dão uma idéia desta através da marcação de fases específicas dentro do ciclo celular. Mas é possível que um tumor tenha uma fração de crescimento elevada e mesmo assim tenha uma atividade proliferativa baixa, devido a uma velocidade muito baixa de percurso do ciclo celular⁷. Infelizmente, apenas nos estudos in vitro é que se tem tido a oportunidade de associar estes dois fatores, fração de crescimento e tempo de geração. Recentemente, foi proposto que o AgNOR nos daria uma estimativa da velocidade com que uma célula está ciclando⁽⁹⁾. Associando-se métodos que avaliem a fração de crescimento (Ki-67) e o tempo de geração (AgNOR), poderíamos ter uma idéia mais precisa da verdadeira atividade proliferativa de uma neoplasia, e subselecionar de forma mais acurada aqueles tumores que proliferam mais rápido.

A avaliação da fração de crescimento através da marcação imuno-histoquímica do Ki-67 nos parece ser o método mais promissor para uso em patologia, devido à relação biológica bem definida desta proteína com o ciclo celular, à facilidade com que o método pode ser aplicado, e à sua suscetibilidade relativamente pequena a fatores técnicos em um laboratório de imuno-histoquímica bem estabelecido. Ao contrário da gama enorme de marcadores que aparecem, são estudados e descartados constantemente, o Ki-67 parece ser um marcador que veio para ficar⁽⁴⁰⁾.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray A, Evan G, Hunt J, Nurse P. The cell-division cycle. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell*, 3th ed., Garland Publishing, Inc, 1994, p.863-910.
2. Holfstädter F et al. Meeting Report - Cell proliferation assessment in oncology. *Virchow Arch* 1995, 427:323-341.
3. Graem N, et al. Mitotic activity and delay in fixation of tumor tissue. *Acta Pathol Microbiol Scand (A)* 1979, 87:375.
4. Donhuijsen K et al. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Hum Pathol* 1990, 21:709-714.
5. Baak JPA et al. The Multicentric Morphometric Mammary Carcinoma Project (MMMCP). A nationwide prospective study on reproducibility and prognostic power of routine quantitative in the Netherlands. *Pathol Res Pract* 1989, 185:664
6. Baak JPA. Mitosis count in tumors. *Hum Pathol* 1990, 21(7):683-684,
7. Quinn CM et al. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990, 160:93-102,
8. Ploton D et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986, 18(1):5-14
9. Brugal G. Interpretation of proliferation markers. *Virchow Arch* 1995, 427:337-339.
10. Gerdes J et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983,31:13-20,
11. Gerdes J et al. Cell Cycle Analysis of a Cell Proliferation-Associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-67. *J Immunol* 1984,133(4):1710-1715,
12. Verheijen R et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Science* 1988 , 92:123-30,
13. Verheijen R et al. Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromossomes. *J Cell Science* 1989, 92:531,
14. Gerdes J et al. Immunobiochemical and Molecular Biologic Characterization of the Cell Proliferation-associated Nuclear Antigen That is Defined by Monoclonal Antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991,138(4):867-73,
15. Schonk DM et al Assignment fo the genes(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromossome 10. *Human Genet* 1989,83:297-9,
16. Graem G et al. Monoclonal Antibodies Against Recombinant Parts of the Ki-67 Antigen (MIB 1 and MIB 3) Detect Proliferating Cells in Microwave-Processed Formalin-Fixed Paraffin Sections. *J Pathol* 1992, 168:357-63,
17. Key G et al. New Ki-67-Equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterally expressed parts of the Ki-67 cDNA Containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993, 68(6):629-36
18. Bruno S et al. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected bby ki-67 antibody and HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992,25(1):31-40
19. Scott RJ et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991,165:173-178
20. Miyachi K et al. Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978, 121:2228-2234
21. Takasaki Y et al. A nuclear antigen associated with a cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronised cells. *J Exp Med* 1981,154:1899-1909,

22. Mathews MB et al. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984, 303:374-376,
23. Ghnassia JP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Service d'Anatomie Pathologique, Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss, Strasbourg. *Ann Pathol*, 1996 Sep, 16:4, 241-6
24. Almendral JM et al. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. *Proc Nat Acad Sci* 1987, 84:1575-1579,
25. Suzuka I et al. Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta protein) is present both in mammalian and higher plant genomes. *Proc Nat Acad Sci* 1989, 86:3189-3193,
26. Wasseem NH et al. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci*, 1990,96 (1):121-9
27. Dervan PA et al. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol*, 1992,97(5)Suppl 1, S21-8
28. Visakorpi T. Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol*, 1992, 168(1):7-13
29. Rowlands. The effect of tissue fixation on immunostaining for proliferating cell nuclear antigen with the monoclonal antibody PC10. *J Pathol* 1990,165:356,
30. Bravo R et al. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987, 105:1549-1554,
31. Hall PA et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990, 162(4):285-94
32. Start RD et al. Delay in fixation does not affect the immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Pathol* 1992, 168:167-99,
33. Mello ES et al. Tempo de fixação e resultados imuno-histoquímicos quando usada a recuperação de epitópos induzida pelo calor. *J Bras Patol* 1997, 33(supl):9
34. McCormick CY, et al. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathol* 1993, 22:543-547.
35. Mello ES, Alves VAF, 1998 . Determinação da fração de proliferação celular no carcinoma de mama através da marcação imuno-histoquímica do antígeno nuclear Ki-67: uma comparação dos métodos visuais para avaliação na prática diária. *J Bras Patol* 1998 (no prelo)
36. Maeda MYS et al. Comparison of two approaches for evaluation of immunoreactivity of p53, Ki67 and PCNA in cervical lesions: subjective and counting procedures. *International Congress of Cytology* , Tokyo 1998
37. Dodd LG et al. *J Surg Oncol* 1997,64:280-8
38. Connor AJM et al. Intratumoral heterogeneity of proliferation in invasive breast carcinoma evaluated with MIB1 antibody. *The Breast* 1997, 6:171-176,
39. Page DL et al. Measures of proliferation in breast cancer: practicality and utility. *The Breast* 1997, 6:169-170,
40. Schwarting R. Little Missed Markers and Ki-67. *Lab Invest* 1993, 68(6):597-599

INTRODUÇÃO

As técnicas de imuno-histoquímica são procedimentos de grande importância em patologia de doenças infecciosas porque permitem identificar com precisão os agentes etiológicos nas lesões. Além do mais, também propiciam o estudo mais aprofundado da resposta tecidual desenvolvida pelo hospedeiro à infecção, através da caracterização fenotípica das células constitutivas da reação inflamatória, de citocinas e outros fatores participantes do processo lesional.

Deve-se ressaltar que as referidas técnicas podem ser efetuadas em um grande número de espécimes como esfregaços, citocentrifugados, materiais congelados, fixados em formol (ou outros fixadores usados habitualmente em anatomia patológica) e emblocados em parafina.

Tradicionalmente, os agentes infecciosos são detectados por procedimentos microbiológicos de pesquisa direta, de cultura ou através de reações sorológicas e, mais recentemente, por técnicas de biologia molecular, sendo pesquisados no sangue periférico ou em material obtido dos órgãos ou sistemas acometidos. Em pacientes imunocompetentes esses procedimentos são de incontestável valor diagnóstico. Nos pacientes imunocomprometidos, face à disfunção do sistema imune, as reações sorológicas já não são tão eficazes para auxiliar na definição do diagnóstico etiológico. Nesse grupo de pacientes a imuno-histoquímica tem contribuído de maneira muito efetiva e dinâmica para o diagnóstico dos processos infecciosos.

Um problema relevante diz respeito à latência, já comprovada em uma gama cada vez maior de microrganismos. Esta comprovação leva-nos a reavaliar a contribuição dos métodos qualitativos de biologia molecular, como o PCR, que, amplificando mínimas seqüências genômicas de agentes infecciosos, poderiam não caracterizar a atividade de um processo patológico e sim, a sua latência. Desta forma, as reações imuno-histoquímicas desempenham um papel no sentido de caracterizar a atividade da doença através da análise das características histológicas das lesões e sua correlação com o agente infeccioso que a provoca.

Métodos sensíveis, incluindo etapas de recuperação antigênica aliados a anticorpos de boa qualidade, sejam mono ou policlonais e desenvolvidos segundo um procedimento onde todas as etapas são realizadas minuciosamente, fazem da imuno-histoquímica uma ferramenta de expressiva utilidade na patologia diagnóstica (1).

Devido a grande especificidade da maioria dos anticorpos comerciais ou de outros desenvolvidos nos laboratórios de pesquisa, é possível detectar-se não só o agente infeccioso íntegro mas também formas diferentes de apresentação antigênica. Dessa maneira, consegue-se a elucidação de muitos casos onde o agente não pode ser identificado pelas colorações histoquímicas usuais (2,3).

Faremos a seguir uma breve apreciação em relação aos anticorpos mais utilizados em material fixado em formol e embebido em parafina e que dão uma contribuição expressiva para o diagnóstico em doenças infecciosas.

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS

Citomegalovírus (CMV)

Este é um dos anticorpos mais difíceis de padronizar qualquer que seja o fornecedor do anticorpo primário, necessitando de uma monitorização freqüente.

É de extrema valia para diagnóstico de lesões em pacientes imunocomprometidos, onde, apesar da presença de lesões histopatológicas intensas, não são encontradas as inclusões intranucleares características em "olho de coruja". Por outro lado, costuma-se observar aumento do volume e hiper cromasia de núcleos, constituindo as inclusões nucleares tipo I e II, relacionadas ao CMV e que nos preparados histológicos não podem ser diferenciadas das chamadas atípias inflamatórias.

A pesquisa de material antigênico relacionado ao CMV deve ser efetuada em todos os casos atinentes a pacientes imunocomprometidos. Se a reação imuno-histoquímica é positiva no preparado, deve-se identificar quais células expressam o antígeno viral, com o intuito de caracterizar-se a latência, colonização ou se o CMV está diretamente provocando a lesão. Sabe-se que, por exemplo, a infecção prévia pelo CMV se aproxima de 100% em algumas populações de risco para aquisição do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). Considerando estes dados, para caracterizar o CMV como determinante do processo inflamatório é necessário que o material antigênico detectado seja expresso especialmente em células endoteliais de capilares ou outros vasos com vasculite e não apenas em células epiteliais glandulares que representam o seu habitat natural.

Entre os anticorpos disponíveis para detecção do CMV está o M854 (DAKO). Este anticorpo é constituído de dois monoclonais – DDG9 e CCH2 – e reage com antígenos imediatamente inicial, inicial e tardio (4,5). Na nossa experiência este anticorpo tem oferecido resultados fidedignos e menos reação inespecífica de fundo.

A positividade da reação caracteriza-se por imunomarcção preferencial dos núcleos, notando-se também material particulado no citoplasma.

Herpes vírus, tipos I e II

O anticorpo B114 (DAKO) reage com antígenos específicos do Herpes tipo I e com antígenos em comum do Herpes tipo II (B 116), não diferenciando portanto os tipos I e II. Não oferecem reação cruzada com outros tipos de Herpes vírus. Marcam as principais glicoproteínas presentes no envelope viral e pelo menos uma proteína do core (6).

Além de caracterizar com segurança a etiologia herpética de processos lesionais diversos em pacientes imunocompetentes, são decisivos para esclarecer a etiologia de lesões atípicas em imunocomprometidos, especialmente no tubo digestivo, sistema nervoso, linfonodos e lesões verrucosas perianais.

Nos pacientes com disfunção do sistema imunológico nem sempre são visualizados à histologia os sincícios, o amoldamento dos núcleos e as inclusões nucleares (Cowdry tipo A), características da lesão herpética. Com a metodologia imuno-histoquímica, o material antigênico representativo de glicoproteínas virais é facilmente detectado em núcleos e citoplasma de células morfológicamente preservadas, como também, com grande especificidade no material necrótico das lesões. Esta última

característica é de utilidade, principalmente em lesões ulceradas de esôfago, na eventualidade da biópsia endoscópica representar apenas a ulceração e não a mucosa mais preservada.

Tem ainda aplicação valiosa para estudos e diagnóstico de alterações da placenta.

Vírus da imunodeficiência adquirida (p24)

Anticorpo de difícil padronização, devido a exigüidade da proteína viral em algumas fases da infecção pelo HIV. Necessita para sua demonstração procedimentos de recuperação antigênica tais como micro ondas ou calor úmido.

O anticorpo anti proteína p24 (M857-DAKO), reage com a proteína p24 do HIV tipo 1 e não cruza com o HIV tipo 2.

O material antigênico particulado pode ser demonstrado com facilidade na fase aguda de infecção pelo HIV, especialmente nas células foliculares dendríticas dos folículos linfóides dos linfonodos, em linfócitos paracorticais e em monócitos/macrófagos de diferentes tecidos. Na fase de latência clínica e nas fases crônicas da Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (AIDS), nos linfonodos, a proteína p24 do HIV é observada de maneira muito evidente nas células foliculares dendríticas dos folículos linfóides nas etapas de linfadenopatia acompanhadas de hiperplasia folicular com e sem fragmentação dos folículos. Em outros órgãos a proteína p24 é passível de ser demonstrada, em macrófagos/monócitos (incluindo células de Kupffer e células microgliais), células endoteliais e eventualmente em linfócitos. Ocasionalmente o diagnóstico de AIDS pode ser firmado através da identificação da proteína p24 nos tecidos, em casos de necrópsias nas quais não se dispõe de outros dados clínicos ou laboratoriais que caracterizem a doença.

Adenovírus

A imuno-histoquímica para detecção de Adenovírus vem sendo cada vez mais empregada para implicar ou afastar a participação deste vírus nas pneumonias intersticiais, em lesões de tubo digestivo de pacientes com AIDS ou em casos de transplante. Particularmente em transplantados renais, temos verificado lesões de necrose tubular e nefrite intersticial determinadas por este vírus.

O anticorpo MAB805 (Chemicon) marca todos os 41 sorotipos de adenovírus, mostrando padrão nuclear e citoplasmático (7). Deve-se ter um cuidado especial para evitar as reações inespecíficas, utilizando-se títulos baixos do anticorpo primário.

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS

Leptospira sp

A caracterização de antígenos de *Leptospira* em tecidos contribui muito para o diagnóstico rápido da doença, sendo de grande valia nos casos graves de Leptospirose de difícil diagnóstico diferencial com sepsis por outras bactérias, quando ainda não estão disponíveis os resultados de cultura e as reações sorológicas para a *Leptospira* ainda são negativas. Para esse fim desenvolvemos uma técnica de biópsia do músculo da panturrilha com utilização de reação imuno-histoquímica que fornece diagnóstico com alta

sensibilidade (98%) e especificidade (100%) (8).

A reação imuno-histoquímica tem ainda uma grande aplicabilidade para o estudo da patogenia das lesões (9,10).

Os antígenos relacionados à *Leptospira* são observados nas células endoteliais vasculares de diferentes órgãos e no interstício dos tecidos, como por exemplo nos rins, músculo esquelético, pulmões, etc.

Não existe anticorpo comercial disponível. Utilizamos o anticorpo primário desenvolvido em coelho pelo Prof. Paulo Yasuda no Instituto de Ciências Biomédicas-USP (11).

Treponema sp

A utilização da imuno-histoquímica em casos de Lues ajuda na caracterização de lesões não habituais em indivíduos imunocompetentes e, especialmente, em imunocomprometidos. Em pacientes com AIDS, por exemplo, é decisiva para diagnosticar os quadros de Lues Maligna. Nesta situação se impõe o diagnóstico histológico diferencial com Linfoma T cutâneo. Ainda contribui para diferenciação do comprometimento luético gástrico daquele determinado por linfomas, especialmente do tipo MALT.

Permite também caracterizar casos de espiroquetose intestinal, uma das causas de diarreia, particularmente em doentes com comprometimento do sistema imunológico.

Não são disponíveis no mercado anticorpos comerciais. No nosso laboratório usamos um anticorpo policlonal desenvolvido em coelho pelo Prof. Mario Camargo no Laboratório Fleury.

A imunomarcação se faz através de material particulado ou delimitando as espiroquetas.

Micobactérias

Os anticorpos comerciais existentes não discriminam os diferentes tipos de micobactérias, dando reações cruzadas entre elas (micobactérias tuberculosas, micobactérias não tuberculosas e bacilos da lepra).

Embora as micobactérias compartilhem cerca de 40 determinantes antigênicos com a *Nocardia*, em nossa experiência não temos encontrado reações cruzadas com esta última bactéria nas condições de padronização usuais desenvolvidas em nosso laboratório. É preciso ressaltar que existem diferenças entre a morfologia da *Nocardia* e a de outras micobactérias. A *Nocardia* é bactéria filamentar, ramificada e além de sua propriedade álcool-ácido-resistente também é Gram positiva e prata positiva, o que não ocorre com as micobactérias tuberculosas e o bacilo da lepra. As micobactérias não tuberculosas eventualmente mostram reatividade quando coradas pela prata.

O anticorpo B124 (DAKO) reage, portanto, com diferentes tipos de micobactérias, devido a presença de antígenos comuns. (12).

Na tuberculose a utilização diagnóstica da imuno-histoquímica tem particular aplicação nos casos com pequeno número de bacilos como aqueles com boa resposta imune do hospedeiro e presença de granulomas epitelióides bem formados, sem necrose de caseificação.

Recomendamos a pesquisa imuno-histoquímica sistemática de material antigênico relacionado a micobactérias em todos os casos de reação granulomatosa sem agente etiológico definido. Também presta grande auxílio nos casos de biópsia de pleura, onde tradicionalmente é difícil o encontro de bacilos. Ainda contribui para caracterização da etiologia do processo em casos de tuberculose submetidos a terapêutica específica, eventualidade em que as paredes das bactérias são alteradas precocemente e assim dão resultados negativos nas reações histoquímicas (Ziehl-Neelsen, Fite Faraco etc) o que não acontece com a pesquisa imuno-histoquímica.

A imuno-histoquímica no estudo da hanseníase paucibacilar é de grande contribuição, sendo um dos poucos meios para se chegar ao diagnóstico específico. Em estudo de biópsias de pele de pacientes com hanseníase, verificou-se cinco padrões diferentes de apresentação de antígeno, e de 28 casos negativos pesquisados através de técnicas histoquímicas, 13 revelaram-se positivos pela imuno-histoquímica (2).

Vale a pena assinalar que a imunomarcagem não reproduz a morfologia dos bacilos. Identifica-se material antigênico particulado, por entre as células epitelióides, no citoplasma de macrófagos, em meio ao material necrótico ou nas células de Schwann.

Legionella

O anticorpo MAB830 (Chemicon) reage fortemente com sorogrupo tipo 1 e mais fracamente com uma mistura dos tipos 1, 2 e 3 das Legionellas. Não cruza com *Klebsiella pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

Temos utilizado a reação com finalidades diagnósticas e para esclarecimento etiológico de pneumopatias, particularmente em pacientes transplantados renais.

A reação positiva mostra material particulado no citoplasma dos macrófagos presentes nos alvéolos e septos e também livre no espaço alveolar.

Bartonelas (*B. quintana* e *B. hanseniae*)

Não há disponibilidade comercial de anticorpos primários contra estas bactérias.

Desenvolvemos pioneiramente em nosso meio a reação imuno-histoquímica para esses agentes e que tem sido muito útil para caracterizar os casos de angiomatose bacilar, diferenciá-los do sarcoma de Kaposi, para mostrar a concomitância dos dois processos ou ainda para diferenciação com quadros de granuloma piogênico e hemangioma capilar. Os anticorpos nos foram cedidos pelo Prof. Mario Camargo que os obteve a partir da inoculação em coelhos de bactérias oriundas de culturas cujas cepas iniciais lhes foram fornecidas pelos Drs. R. Regenerly e T. Tzianakis, Viral and Rickettsial Zoonoses Branch-Atlanta USA (13).

Após padronização e implantação da reação pôde-se verificar que a maioria dos casos testados de Angiomatose bacilar, em nosso meio, são determinados por *B. quintana*. Somente um paciente dessa casuística apresentou Angiomatose bacilar determinada por *B. hanseniae*. Esse paciente tinha como parceiro sexual um americano, onde são descritos casos de Angiomatose Bacilar preferencialmente determinados por *B. hanseniae*. Outros casos de Angiomatose bacilar testados posteriormente também comprovaram os dados da casuística inicial pois tivemos apenas mais dois casos da doença causada por *B. hanseniae*. Parece, portanto, haver uma expressão regional do tipo de Bartonella causadora de Angiomatose bacilar.

A reação imuno-histoquímica também permite o diagnóstico específico de *B. hanselae* causando a doença da arranhadura do gato.

Em relação a esta última doença julgamos que a pesquisa de antígenos de Bartonellas deve ser efetuada em linfonodos que apresentem processo granulomatoso, mostrando necrose central com debris celulares e aspecto geográfico do processo, afim de que possa ser feita a exata caracterização etiológica do acometimento e a diferenciação principalmente da lesão causada por *Yersinia enterocolitica*.

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DE FUNGOS

Os pacientes com comprometimento do sistema imune têm uma maior chance de desenvolver infecções por outros fungos que não aqueles cuja morfologia é conhecida do patologista. Surgem dúvidas de interpretação e neste contexto é importante um método que demonstre especificidade para o fungo. Sabe-se que muitos fungos causadores das chamadas micoses profundas compartilham numerosos determinantes antigênicos o que propicia reações cruzadas entre eles. Todavia, dispendo de painéis de anticorpos, testando-os e titulando-os para as condições específicas de cada laboratório é possível fazer-se com segurança o diagnóstico específico.

Candida sp

O anticorpo B 143 (DAKO) reage com cerca de 80 diferentes antígenos de *C. albicans*, incluindo proteínas da parede celular e citoplasma.

Em trabalho desenvolvido em nosso laboratório, utilizando o anticorpo B143 observamos uma boa especificidade do mesmo para *Candida sp* com imunomarcacão fortemente positiva, sob a forma de material particulado que não reproduz nitidamente as formas do fungo (pseudo-hifas e leveduras). Com este anticorpo notamos, entretanto, uma fraca reação cruzada com *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schencki*. Não apresenta reação cruzada com *Criptococcus neoformans* ou com *Pneumocystis carinii* (14).

Sua contribuição diagnóstica ocorre especialmente naqueles casos submetidos a tratamento profilático ou curativo anterior, quando os fungos mostram-se fragmentados. Auxilia também nos casos disseminados da doença com a finalidade de caracterizar o acometimento de órgãos onde a densidade fúngica é escassa, o que impede a sua exata identificação através de metodologia histoquímica.

Criptococcus sp

O anticorpo B 3602 (DAKO) reage com a parede celular e cápsula do criptococo. É um anticorpo muito específico.

Testamos sua especificidade em nosso laboratório e não verificamos reação cruzada com outros fungos patogênicos para o homem como sejam: *Candida sp*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporotricum schenk*, *Pneumocystis carinii*. (14) ou mesmo os fungos causadores de Aspergilose e Mucormicose.

Julgamos que esse anticorpo auxilia o diagnóstico predominantemente quando a criptococose é determinada por fungos pequenos com escassa cápsula difícil de ser

demonstrada pela reação histoquímica de Mucicarmin de Mayer. Além do mais é de grande ajuda diagnóstica em casos sob tratamento nos quais os fungos presentes são fragmentados ou degenerados e de interpretação duvidosa pelas colorações específicas.

Paracoccidioides brasiliensis

Até o momento desconhecemos a existência de anticorpos comerciais dirigidos contra este fungo.

Os anticorpos anti-Pb113 e GP 43 têm sido utilizados em pesquisas humanas e experimentais. Temos empregado estes anticorpos para esclarecimento diagnóstico em pacientes imunocompetentes com pequena quantidade de fungos em virtude de tratamento prévio, em pacientes imunocomprometidos com lesões não usuais e também para caracterizar a participação do *P. brasiliensis* e outros agentes numa mesma reação.

Os anticorpos foram cedidos pela Profa. Maria Aparecida Shikanai-Yasuda do Depto. de Doenças Infecciosas e Parasitárias – HCFMUSP (15).

Este anticorpo mostrou fraca reação cruzada com histoplasma e candida (14).

Histoplasma sp

Anticorpos primários para este fungo não constam das listagens comerciais.

A imuno-histoquímica para detecção deste fungo tem aplicação contributória quando há poucas formas fúngicas no preparado, em casos previamente tratados onde os fungos mostram-se degenerados impossibilitando sua caracterização pelas colorações específicas e naquelas situações de apresentação não usual da doença, em imunocomprometidos.

É preciso ter em mente que o patologista, usando apenas colorações específicas, mesmo as que têm a prata como base, faz o diagnóstico de Histoplasmose nos tecido por exclusão. Emite tal diagnóstico após afastar a possibilidade de *P. brasiliensis* (ampla variação e tamanho e múltipla esporulação) e de criptococos (método de Mucicarmin de Mayer).

Dispomos de um anticorpo policlonal produzido em coelho que nos foi fornecido pela Dra. Gilda del Negro do Laboratório de Micologia da FMUSP e que temos utilizado durante muitos anos (16).

Em nosso trabalho (14), demonstramos que este anticorpo é altamente específico, não cruzando com os fungos acima citados. Dessa maneira, mesmo em pacientes imunocompetentes temos recorrido a este procedimento para caracterização etiológica em casos duvidosos.

Pneumocystis carinii

O anticorpo M 778 (DAKO) revela um padrão de reação em forma de anel que corresponde às formas císticas do *P. carinii*, observando-se também positividade que delinea os corpos intra-císticos e ainda produto antigênico particulado marcando o material de aspecto espumoso visto à coloração pela hematoxilina-eosina. O anticorpo é de grande especificidade, não exibindo reação cruzada com outros fungos.

A interferência dos tratamentos profiláticos e curativos para este fungo modificou

nos últimos anos a própria apresentação da pneumonia intersticial característica. Assim é que tem-se observado numerosas formas atípicas de envolvimento pulmonar com organização fibrosa intra-alveolar e septal, formação de granulomas, cavitações, desaparecimento do material eosinofílico espumoso etc. Nestes casos os fungos são escassos ou mostram-se bastante alterados em sua forma, além de freqüentemente fragmentados, impossibilitando o diagnóstico por metodologia histoquímica. Atualmente, em pacientes com AIDS, tais aspectos histológicos são mais freqüentes que a Pneumonia intersticial característica. Dessa maneira, para se firmar o diagnóstico etiológico de envolvimento pulmonar ou sistêmico pelo *P. carinii* necessita-se da reação imuno-histoquímica a qual demonstra com facilidade material antigênico particulado nas lesões (17). Uma outra alternativa é recorrer-se à microscopia eletrônica (17).

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DE PROTOZOÁRIOS

Toxoplasma

A reação imuno-histoquímica para detecção deste agente é fundamental para caracterização de uveites, retinites (18), miocardites, comprometimento da placenta em pacientes imunocompetentes e particularmente das encefalites e de lesões atípicas em pacientes imunocomprometidos (19).

O anticorpo B1013 (DAKO) não apresenta reação cruzada com *Cryptosporidia*, *Microsporidia*, *Histoplasma*, *Candida*, *Blastomyces*, *P. carinii*, *Aspergillus*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptococcus neoformans* e *M. tuberculosis* sendo de fácil aplicação prática.

Utilizamos também um anticorpo policlonal produzido em coelho, produzido pelo Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – FMUSP, cujas características de imuno-marcação são semelhantes ao anticorpo comercial acima citado.

Tripanosoma cruzi

Não há em disponibilidade no mercado anticorpos comerciais para identificação deste agente, muito embora, existam no nosso meio alguns centros de pesquisa que possuem anticorpos específicos de excelente qualidade que são usados habitualmente em investigações científicas.

Convém ressaltar que a infecção por *T. cruzi* em pacientes transplantados e nos co-infectados pelo HIV determina alterações teciduais graves, diferentes da Doença de Chagas usual, como por exemplo os quadros de encefalite necrotizante nos pacientes com AIDS, as lesões cutâneas vistas em pacientes transplantados não devendo ser esquecida a miocardite de reativação. Nestas eventualidades é necessário caracterizar o agente nas lesões, particularmente diferenciando-os do *Toxoplasma* e de outros protozoários como *Isospora*, *Microsporidium*, etc. Para isso a imuno-histoquímica tem um papel diagnóstico bastante relevante.

A identificação do agente se faz através do delineamento das formas amastigotas constituindo os ninhos parasitários, de material particulado intracelular (fibras musculares, neurônios, macrófagos) ou intersticial (20).

Em nosso laboratório usamos o anticorpo policlonal desenvolvido em coelho pelo Prof. Dr. Alfredo José A. Barbosa do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e que nos foi cedido pela Profa. Dra.

Maria de Lourdes Higushi do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (Incor).

Leishmania sp

Alguns centros nacionais de pesquisa dispõem de anticorpos para identificação de Leishmanias, todavia tais anticorpos não estão comercializados.

Julgamos que as leishmanias representam um dos agentes que suscitam maiores dúvidas diagnósticas, tanto nos preparados corados pela HE como também naqueles corados pelo Giemsa ou outros métodos histoquímicos, sendo com frequência muito difícil diferenciá-las de debris celulares e eventualmente de outros protozoários.

Na Leishmaniose tegumentar, principalmente nos casos causados pela *L (V) brasiliensis* os parasitas são muito escassos nas lesões (20 a 28%). Usando a metodologia imuno-histoquímica verificamos que a caracterização etiológica eleva-se para 70% (3).

Na leishmaniose visceral, este método é também de grande importância diagnóstica, principalmente nos casos de pacientes oligossintomáticos que exibem um padrão nodular de comprometimento hepático ou um padrão fibrogênico (21). Em geral, estes pacientes têm pesquisa direta ou cultura de leishmania negativas na medula, sendo o diagnóstico de Leishmaniose firmado pela imuno-histoquímica.

O anticorpo anti-Leishmania que utilizamos foi produzido em nosso laboratório e marca as formas amastigotas das diferentes leishmanias, assim como antígenos particulados das mesmas presentes em macrófagos ou no interstício. Apresenta fraca reação cruzada com *T. cruzi* e não marca outros agentes infecciosos testados.

Criptosporidium

O anticorpo MAB 8935 (Chemicon) é dirigido a um antígeno de 40kD presente no oocisto do criptosporidio e nas formas em trofozoito. Não reconhece esporozoitos.

Tem utilidade para caracterizar o comprometimento intestinal em casos pauciparasitário e em casos submetidos a tratamento anterior quando é necessário demonstrar a eliminação ou a persistência da infecção.

Plasmodium sp

Para demonstração de material antigênico relacionado aos protozoários causadores de Malária usamos um anticorpo policlonal, produzido em coelho, desenvolvido no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Contribui de maneira decisiva para determinar a etiologia em casos de necrópsias cujo diagnóstico não foi efetivado "in vivo". Através da demonstração de antígeno malárico específico nas células de Kupffer e em células mononucleadas no infiltrado inflamatório sinusoidal hepático, foi possível evidenciar o papel do *Plasmodium sp* na etiologia da esplenomegalia hiperreativa (22).

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DE HELMINTOS

Schistosoma

Não há disponibilidade comercial de anticorpos que identificam antígenos de *Schistosoma*. Alguns centros de investigação nacionais os possuem.

Antígenos relacionados ao *S. mansoni* contribuem para caracterização de lesões granulomatosas onde o ovo ou verme não são identificados e ainda outros tipos de acometimento do rim, fígado e sistema nervoso. Experimentalmente ou em humanos, a imuno-histoquímica auxilia na compreensão de lesões biliares associadas (23).

Dispomos de um anticorpo produzido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela profa. Herminia Yohko Kanamura que marca antígenos relacionados ao ovo e que utilizamos com finalidade de esclarecimento diagnóstico.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Bacchi CE, Gown AM, Bacchi MM. Detection of infectious disease agents in tissue by immunocytochemistry. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1994; 27(12): 2803-2820.
2. Pagliari C, Duarte MIS, Sotto MN. Pattern of mycobacterial antigen detection in leprosy. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1995; 37(1):7-12.
3. Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, Matta VLR, de Brito T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta tropica* 1989; 46: 121-130.
4. Zweyberg Wirgart B, Landqvist M, Hokeberg I et al. Early detection of cytomegalovirus in cell culture by a new monoclonal antibody, CCH2. *J. Virol. Methods* 1990; 27:211-220.
5. Niedobitek G. et al. Detection of cytomegalovirus by in situ and immunohistochemistry using new monoclonal antibody CCH2: a comparison of methods. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41:1005-1009.
6. Adams RL, Springall DR, Levene MM, Bushell TE. The immunohistochemical detection of herpes simplex virus in cervical smears – a valuable technique for routine use. *J. Pathol.* 1984; 143:241-247.
7. Koneru B et al. Adenoviral infections in pediatric liver transplant recipients. *JAMA* 1987; 258:489-492.
8. Uip DE. Diagnóstico precoce da leptospirose por biópsia do músculo da panturrilha. Tese de mestrado apresentada a Faculdade de medicina da USP – 1989.
9. Alves VAF, Gayotto LCC, Yasuda PH, Wakamatsu A, Kanamura C, de Brito T. Leptospiral antigens in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relation to the pathogenesis of renal injury. *Exp. Pathol.* 1994; 42:81-93.
10. Alves VAF, Gayotto LCC, de Brito T, Santos RTM, Wakamatsu A, Vianna MR, Sakata EE. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pigs and their relation to the morphogenesis of liver damage. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1994; 44:425-434.
11. DeBrito T, Prado MJBA, Negreiros VAC, Nicastrí A L, Sakata EE, Yasuda PH, Santos RT, Alves VAF. Detection of leptospiral antigen (*L. interrogans* serovar *copenhageni* serogroup icterohaemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea pigs. *Int. J. Exp. Pathol.* 1992; 73: 633-642.
12. Harboe M, Mshana RN, Closs O, Kronvall G, Axelsen NH. Cross-reaction between mycobacteria. *Scand. J. Immunol.* 1979; 9:15-124.
13. Duarte MIS, Oliveira MS, Lula DAA, Camargo M, Pozzan G. Diagnóstico etiológico da angiomatose bacilar por reação imuno-histoquímica. *News Lab ed.* 1996; 15 pg. 100-102.
14. Rocha DCA, Duarte MIS, Pagliari C, Santini MS. Immunohistochemistry diagnosis of fungal infections. In XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia. 28/09 a 01/10 de 1997 – Mangaratiba RJ.
15. Shikanai-Yasuda MA, Duarte MIS, Pagliari C, Mendes-Giannini MJS, Assis CM, Duarte AJS, Amato Neto V. Immunohistochemical study IgG anti-GP43 and anti-Pb113 policlonal antiserum in experimental *P. brasiliensis* infection in isogenic rats. *Rev. Arg. Micologia* 1992; Vol. XV, pag. 55.
16. Garcia NM, Assis CM, Del Negro GMB, Lacaz CS. Obtenção de exoantígenos de *Histoplasma capsulatum* em meio de neopeptona, glicose, tiamina e asparagina (NGTA). *Rev. Inst. Med. Trop.* 1990; 32(5): 370-374.
17. Focaccia R, Duarte MIS, Oliveira MS. Pneumocistose (in Tratado de Infectologia – Veronesi R. e Focaccia R. editora Atheneu-1997).

18. Corrêa M^CJM, Duarte MIS, Silva MALG, Amato VS, Amato JGP, Amato Neto V. Toxoplasmose ocular – utilização de reação imuno-histoquímica para diagnóstico. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo 1996; 51(4): 141-143.
19. Conley FK et al. Toxoplasma gondii infection of the central nervous system. Use of the peroxidase anti-peroxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Human Pathol. 1981; 12: 690.
20. Amato JGP, Amato Neto V, Amato VS, Duarte MIS, Uip DE, Boulos M. Lesões cutâneas como únicas manifestações de reativação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em receptores de rim por transplante. Revista do Instituto de Med. Trop. 1997; 30(1): 61-63.
21. Duarte MIS & Corbett CEP. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1987; 29(3): 131-136.
22. Duarte MIS, Boulos M, Segurado AAC, Oliveira MS, Araujo ESA, Silva MALG, Pagliari C, Amato Neto V. Hyperreactive malarious splenomegaly: immunohistochemical demonstration of *Plasmodium falciparum* antigen in liver cells. Transaction of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene 1997; 91, 429-430.
23. Vianna MR, Gayotto LCC, Santos RTM, Alves VAF, Fukushima J, de Brito T. Intrahepatic bile duct changes in human hepatosplenic schistosomiasis. Liver 1989; 9:100-109.

ANEXO 1

Imuno-histoquímica em Doenças Infecciosas: Anticorpos em uso, diluições e recuperação antigênica					
Anticorpo anti-	Diluição sem recup. antigênica	Recup. antigênica com Tripsina	Recup. antigênica com Microondas	Recup. antigênica com calor úmido	Código/Fonte
Adenovirus	-	1:400	-	-	MAB805/Chemicon
BaQ	-	1:300	-	-	Lab. Fleury
BaH	-	1:300	-	-	Lab. Fleury
Candida	1:4000	-	-	-	B143/DAKO
Citomegalo	-	-	1:50 *	1:50 *	M854/DAKO
Criptosporidio	1:800	-	-	-	MAB8935/Chemicon
Criptococo	1:800	-	-	-	B3602/DAKO
Epstein-Barr	-	-	1:50 *	1:50 *	M897/DAKO
HBc	1:8000	-	-	-	B586/DAKO
HBs	1:500	-	-	-	B560/DAKO
Herpes I	1:3000	-	-	-	B114/DAKO
Herpes II	1:3000	-	-	-	B116/DAKO
Histoplasma	1:1000	-	-	-	IMT-FMUSP
HIV-p24	-	-	-	1:80	M857/DAKO
Leishmania	-	-	1:1000 *	1:1000 *	FMUSP
Legionella	-	1:800	-	-	MAB830/Chemicon
Leptospira	1:10000	-	-	-	ICB-FMUSP
Micobacteria	1:80000	-	-	-	B124/DAKO
Papilomavirus	1:2000	-	-	-	B580/DAKO
Pb113	1:100	-	-	-	IMT-FMUSP
P. falciparum	1:1000	-	-	-	ICB-USP
P. carinii	1:200	-	-	-	M778/DAKO
Shistosoma	1:2000	-	-	-	FCF-USP
Toxoplasma	1:3000	-	-	-	B1013/DAKO
Treponema	-	1:4000	-	-	Lab. Fleury
T. cruzi	1:4000	-	-	-	INCOR

Lab. da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis (* Sensibilidade semelhante)

19. PAPILOMAVÍRUS

José Vassallo, Glauce Aparecida Pinto e Liliana A. L. De Angelo Andrade

INTRODUÇÃO

Os papilomavírus humanos (HPVs) compõem um grupo heterogêneo vírus de DNA que infectam predominantemente os epitélios escamosos, causando hiperplasia papilomatosa e lesões verrucosas no homem e em um grande número de animais. São vírus epiteliotrópicos, com afinidades específicas aos diferentes sítios epiteliais e cujo ciclo de vida está relacionado à diferenciação da célula escamosa^(1,2). A infecção ocorre nas células basais do epitélio e a replicação viral produtiva começa quando as células filhas sofrem maturação. O DNA do HPV é replicado em alto número de cópias em células próximas à superfície do epitélio, onde o material genético do vírus e as proteínas do capsídeo combinam-se para formar partículas virais maduras. Uma vez ocorrida a infecção, o HPV permanece dormente (infecção latente) ou sofre replicação intranuclear ativa com síntese de partículas infectantes. O padrão do DNA viral nas lesões benignas e malignas é diferente. Apresenta-se sob a forma circular e não integrada ao genoma celular (epissomal) nas lesões benignas e integrado nas malignas⁽³⁾.

Através de técnicas de biologia molecular, pode-se distinguir mais de 90 tipos diferentes de HPV, sendo cada tipo ou grupo de tipos mais prevalente em diferentes lesões:

1. **Tumores cervicais e de vulva** - em geral, os HPV 6b e 11 estão associados com verrugas genitais benignas e NIC de baixo grau, enquanto os tipos 16 e 18 são encontrados em até 80% dos casos de NIC II e III e em até 90% dos tumores invasivos⁽⁴⁻⁸⁾. Desta forma, os HPV podem ser subdivididos em grupo de baixo (6b e 11) e alto risco (16 e 18), quanto à associação com lesões malignas ou de potencial maligno. Num estudo adicional, o HPV 18 mostrou associação com adenocarcinomas do colo uterino e o 16 com os de diferenciação escamosa⁽⁹⁾. O tipo 18 também associou-se com tumores de progressão mais rápida e de maior agressividade que o tipo 16. Para o HPV 18, a prevalência foi maior em indivíduos mais jovens⁽⁹⁾. Outros tipos, tais como os 31, 33, 35, 39, 42 e 45 já foram encontrados tanto em neoplasias cervicais benignas, quanto malignas^(10,11), sendo considerados potencialmente associados a lesões malignas ou de risco intermediário. A mesma distribuição foi encontrada em lesões vulvares^(4,7).
2. **Tumores dos tratos respiratório e digestivo** - papilomas benignos da boca, laringe e esôfago freqüentemente contêm DNA de HPV, sendo que os tipos 6b e 11 podem ser encontrados em mais de 90% dos papilomas juvenis e de adultos^(12,13).
3. **Tumores de pele** - mais de 20 tipos de HPV já foram identificados em lesões de pele associadas com epidermodisplasia verruciforme. Dois tipos em particular, o 5 e o 8 foram encontrados nos carcinomas de células escamosas⁽¹³⁾.
4. **Tumores anogenitais** - também nesta região, os tipos 6b e 11 foram demonstrados em condilomas e os tipos 16 e 18 em lesões displásicas e carcinomas de células escamosas⁽¹³⁾.

ONCOGÊNESE VIRAL

Existem sólidas evidências epidemiológicas que o HPV está relacionado a lesões malignas do colo uterino, principalmente dos tipos 16 e 18, embora seja claro que outros co-fatores devam estar associados ⁽¹⁴⁾. Como foi exposto anteriormente, a forma do HPV tem importância no processo de oncogênese, sendo que ele se encontra na forma episomal em lesões precoces e integrado ao genoma da célula hospedeira nas lesões malignas. A integração rompe os genes E1/E2 do HPV, o que resulta em perda de seu efeito repressor nos genes E6/E7 do vírus. O efeito disto é a superexpressão das proteínas E6 e E7, que transformam as células hospedeiras, conferindo-lhes imortalização. Demonstrou-se que as proteínas E6 e E7 podem ligar-se a produtos de anti-oncogenes, como as proteínas p53 e Rb, afetando sua ação. Acredita-se que este mecanismo resulte em desregulação do ciclo celular, iniciando a oncogênese. Além disto, estudos demonstraram que as proteínas E6 e E7 dos HPV 16 e 18, de maior potencial oncogênico, ligam-se mais fortemente às proteínas p53 e Rb, respectivamente, que as dos tipos 6 e 11 ⁽¹⁴⁾.

MÉTODOS DE DETECÇÃO

Os estudos de **imuno-histoquímica** (IHQ) usando anticorpos policlonais dirigidos a antígenos comuns aos vários tipos de HPV detectaram-nos somente em cerca de 50% de todas as lesões cervicais induzidas pelo vírus ^(15,16). Anticorpos específicos para cada tipo de HPV não estão disponíveis para uso clínico. Portanto, esta técnica serve apenas para confirmar a relação de uma lesão (principalmente as histologicamente benignas) ao HPV e tem valor apenas quando positiva.

A detecção de tipos específicos de HPV só é possível através das **técnicas de biologia molecular** ^(17,18), que podem ser divididas em:

I. Métodos de hibridização (sem amplificação)

- a) Hibridização por dot (slot) blot (tipo Virapap)
- b) Hibridização in situ em filtro (FISH)
- c) Hibridização in situ
- d) Southern blot (SB)
- e) Hibridização solúvel com amplificação de sinal (teste de captura de híbridos)

II. Métodos de amplificação

- Reação em cadeia da polimerase (PCR) solúvel ou in situ.

Destes, apenas a hibridização in situ (HIS) e a PCR in situ permitem a visualização da morfologia pelo patologista. Todos os demais implicam em maceração dos tecidos para extração do DNA.

Os métodos de hibridização utilizam sondas (probes) marcadas, complementares aos tipos específicos de HPV. A marcação destas sondas foi inicialmente feita apenas com elementos radioativos, o que apresenta as desvantagens inerentes ao trabalho com

este tipo de material (cuidados no manuseio e descarte de seus produtos). Posteriormente, marcação com elementos não radioativos (biotina, fluoresceína, digoxigenina) foi sendo aperfeiçoada, principalmente para a HIS.

Dos métodos de biologia molecular, o que tem sido considerado mais sensível é a **PCR**. Este método é superior ao padrão SB na ordem de 1000 a 100000⁽¹⁹⁾, podendo ser potencialmente utilizado em DNA extraído de material incluído em parafina ou em esfregaços citológicos arquivados. Além da *alta sensibilidade*, a técnica é *relativamente simples* após sua instalação em um laboratório e é *realizada por aparelho*, com vários exames por vez, dentro de um intervalo de tempo curto. Porém, sua maior qualidade torna-se seu maior ponto vulnerável, pois a extrema sensibilidade pode resultar em *falsos positivos*, devido a contaminantes do laboratório. Outra limitação inerente à sua extrema sensibilidade é o *questionamento do valor clínico (para conduta terapêutica) da detecção de quantidades tão pequenas de HPV em um espécime*. Em outras palavras, que impacto acarretará sobre o seguimento ou tratamento de uma paciente, cuja citologia é normal, a informação que a PCR resultou positiva para HPV, o que ocorre em cerca de 12-35% dos casos^{(17,20)?}

O método de **SB** é o padrão ouro, que também permite a determinação da forma de infecção viral (epissomal ou integrada). Embora menos sensível que a PCR, apresenta maior especificidade^(21,22). Como desvantagens deste método, válidas em certa medida também para o **método de dot blot**, podemos relacionar:

- necessidade de maior quantidade de células viáveis para extração de DNA, o que inviabiliza o uso de tecido fixado e incluído em parafina;
- a complexidade da técnica, que requer várias semanas para ser avaliada, além de utilizar preferencialmente sondas marcadas com substâncias radioativas.

Por estas razões, estes métodos têm sido pouco utilizados no estudo do HPV, mais recentemente.

O sistema de **captura de híbridos** baseia-se em hibridização do DNA viral com sondas RNA em solução. A revelação deste teste é feita com anticorpos marcados com fosfatase alcalina, que detectam os híbridos formados, amplificando o sinal, uma vez que milhares de anticorpos aderem aos híbridos. A este método tem sido imputada alta sensibilidade e grande praticidade, permitindo estudos em larga escala, quando comparados com a PCR⁽²³⁾.

O método de **HIS** não apresenta a alta sensibilidade da PCR ou da captura de híbridos. Necessita de 10 a 50 cópias virais por célula para que seja positivo⁽²⁴⁾. Como apresenta a grande vantagem de preservar a morfologia, desenvolveu-se o método de amplificação do fragmento de genoma **PCR in situ** para superar a limitação de sensibilidade da HIS.

A PCR in situ ainda não apresenta unanimidade quanto aos resultados, sendo que o principal inconveniente é a *difusão do produto de amplificação sobre o tecido*, impedindo a avaliação do resultado⁽²⁴⁾. Para superar esta limitação, novos métodos de amplificação do sinal estão sendo desenvolvidos, sendo o principal deles, no momento, a **HIS-CARD** (do inglês *catalyzed reporter deposition*), baseada no sistema biotínil-tiramida, discutido em detalhes no capítulo 21. A sensibilidade deste método foi recentemente avaliada em estudo utilizando HIS tradicional e CARD-ouro⁽²⁴⁾. Neste estudo o método de CARD revelou positividade em células SiHa (células em cultura que contêm 1-2 cópias

de HPV-16 por célula) e em 9 de 10 carcinomas de colo uterino previamente testados com PCR. O método tradicional de HIS não mostrou reatividade nas células SiHa e apenas em 2 dos 10 carcinomas foram positivos. Este método é promissor para o anatomopatologista, estando já comercialmente disponível como CSA (catalyzed signal amplification).

APLICAÇÃO CLÍNICA DA DETECÇÃO DO HPV

As principais aplicações potenciais da tipagem do HPV são ⁽¹⁷⁾:

1. **Detectar o grupo de mulheres com maior risco de evolução para o carcinoma de colo**, principalmente naquelas com diagnóstico de ASCUS (sistema de Bethesda). Nestes casos, as portadoras de HPV dos tipos de baixo grau seguiriam um plano rotineiro, enquanto que as portadoras de tipos de alto grau seguiriam condutas diagnósticas mais completas, como colposcopia, por exemplo. Desta forma, para cada tipo de paciente, um tratamento adequado poderia ser planejado, sem excesso, nem carência de procedimentos.
2. **Possível papel adjuvante no escrutínio em massa para carcinoma do colo uterino** - Com a tipagem do HPV, mulheres portadoras dos tipos de alto risco seriam acompanhadas com maior frequência e cuidado que as portadoras de tipos de baixo risco. O método que tem sido advogado para este fim, pela confiabilidade e simplicidade é a captura de híbridos ⁽²³⁾.
3. **Possível fator prognóstico para carcinoma do colo uterino** ⁽²⁵⁾ - Alguns dados sobre a presença de HPV 18 e maior risco de metastatização linfonodal foram relatados. Porém, neste particular, não há consenso na literatura. Desta forma, o valor prognóstico do tipo de HPV ainda aguarda maiores estudos.
4. **Possível dado para detecção precoce de metástase de carcinoma cervical** - Como no item anterior, não há consenso na literatura sobre o valor da tipagem do HPV para este fim.

Pelo exposto acima, segundo Herrington e Wells ⁽²⁶⁾, ainda não há evidências sólidas para a tipagem rotineira de HPV na histopatologia e citopatologia do colo uterino, mas já existem dados suficientes que garantem a necessidade de maiores estudos da relação entre os tipos de HPV e lesões do epitélio cervical, principalmente das de baixo grau.

AVALIAÇÃO CRÍTICA DOS TESTES PARA A DETECÇÃO DO HPV NAS LESÕES DO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

A partir dos anos 80, temos convivido com uma enorme quantidade de literatura demonstrando a associação do vírus do condiloma humano (HPV) e o câncer do Trato Genital Feminino Inferior. Depois do trabalho de Meisels e Fortin ⁽²⁷⁾, a descrição de lesão citopática do HPV, o **coilocito**, passou a gerar debates inflamados, principalmente quanto às dificuldades de reprodutibilidade diagnóstica e aos diferentes procedimentos de conduta e tratamento.

A citologia oncológica introduzida por Papanicolaou é método importante de triagem e consegue detectar mais 80% das lesões precursoras do câncer do colo uterino.

Estudos mais recentes, associando o método morfológico à pesquisa do DNA do HPV através de técnicas da Biologia Molecular, conseguem aumentar a sensibilidade do exame citológico e também têm contribuído como controle de qualidade na reavaliação de casos falso-negativos ⁽²⁸⁾.

Duas importantes situações fortaleceram a viabilidade dos testes para a detecção do HPV:

- 1) a introdução do sistema Bethesda de classificação citológica que, por dar espaço a um espectro de lesões categorizadas como de natureza incerta (ASCUS), cria um grande mercado para os testes de HPV, com a promessa de melhor categorizar as lesões de baixo grau.
- 2) a melhoria na tecnologia, com o surgimento de métodos não radioativos de detecção do vírus, como a reação de quimioluminescência, consistindo a chamada captura de híbridos.

Frente a esta nova realidade, algumas questões são levantadas:

Por que não usar estes métodos para a prevenção do câncer na população?

Será que a tipagem do DNA do HPV servirá para prever a progressão da doença?

Com a grande quantidade de estudos neste campo, temos observado algumas situações interessantes:

- a) Podem ocorrer casos de detecção do HPV na ausência de doença clínica e isto gera dificuldades na conduta pois não se sabe qual o seu significado.
- b) Algumas reações de detecção são muito sensíveis e de difícil interpretação, podendo criar resultados falso positivos.
- c) O custo econômico destas reações aumentaria enormemente os gastos para os programas de prevenção em populações.
- d) O surgimento do custo emocional para a paciente, que passa a ser portadora de um vírus de alto risco oncogênico.

Os trabalhos que comparam qual é o melhor método de triagem entre os 3 existentes: citologia, colposcopia e tipagem do DNA, concluem que, isoladamente, nenhum é melhor que o outro. O mais simples e barato é a citologia e este método tem o grande mérito de contribuir para a redução da mortalidade do câncer de colo uterino em 70 a 80% nos últimos 30 anos ⁽²⁹⁾.

Estudos de seguimento sem tratamento das lesões precursoras de baixo grau, demonstram que a grande maioria, ou seja, 77% dos casos, regride espontaneamente ⁽³⁰⁾. A persistência do agente viral na lesão é um dado importante para a transformação neoplásica do epitélio. A neoplasia se desenvolve depois de uma infecção persistente por longo tempo, possivelmente auxiliada por outros co-fatores ⁽²⁸⁾.

Assim, o valor de um teste de HPV positivo é muito limitado, pois é um dado isolado e muito incompleto, desde que não pode responder:

- se a infecção persiste ou regride
- se haverá nova infecção pelo mesmo ou outro tipo do vírus
- se uma re-infecção poderá intervir na progressão da lesão.

O estudo de exames repetidos para a detecção do HPV em um grupo de mulheres demonstrou que apenas 30% continuaram positivas no novo exame ⁽³¹⁾. Como a positividade da reação variou em um mesmo caso, acredita-se que algumas mulheres experimentam a completa regressão, enquanto outras sofrem a reativação ou a re-infecção.

Assim, a relevância da tipagem do HPV nas populações ainda não está fundamentada, pois seriam necessários vários testes ao longo do tempo. Não discutimos que o teste possa aumentar a sensibilidade da citologia, entretanto, não substitui o seguimento periódico e a citologia convencional.

Acrescentar ao exame citológico anormal a positividade para o HPV muito provavelmente selecionará mulheres que têm alterações histológicas. Entretanto, se a positividade for para um HPV de alto risco, qual conduta seria melhor indicada? Muitos HPV de alto risco estão associados a lesões de baixo grau e muitas lesões de baixo grau regredem espontaneamente.

A conduta mais agressiva baseada na categoria do HPV poderia aumentar muito o número de mulheres tratadas desnecessariamente. Assim, todo esfregaço anormal, independente do tipo de HPV associado, requer seguimento adequado ⁽³²⁾. Por outro lado, também não estamos autorizados a relegar os casos HPV negativos ou prolongar os intervalos dos exames citológicos, sem alguma forma de cuidado ou seguimento, pois uma nova infecção pode ocorrer.

Concluindo, sabemos que a persistência do vírus na lesão, a re-infecção pelo mesmo vírus ou por outro tipo de maior risco ao longo do tempo, são fatores de transformação epitelial ⁽³³⁾ e portanto, o seguimento periódico com a citologia continua sendo a regra básica e insubstituível. Os testes do HPV podem ser usados para controle de qualidade de laboratórios, em centros de treinamento, ou na reavaliação de casos duvidosos. Não há razão que justifique a sua introdução como método de prevenção, pois não simplifica a conduta nas lesões precursoras ao ponto de reduzir os custos ou as mortes pelo câncer e todas as anormalidades do esfregaço sempre irão requerer seguimento, independente do "status" do HPV na lesão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorincz AT, Quinn AP, Lancaster WD, et al. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 1987; 159: 187-190.
2. Pfister H. Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv. Cancer Res.* 1987; 48: 113-147.
3. Gupta J, Plotti S, Plotti KV, et al. Human papillomavirus-associated early vulvar neoplasia investigated by in situ hybridization. *Am. J. Surg. Pathol.* 1987; 11: 430-434.
4. Syrjanen KJ. Human papillomavirus (HPV) infections of the female genital tract and their associations with intraepithelial and squamous cell carcinoma. *Pathol. Annual* 1986; 21: 53-89.
5. Brescia RJ, Jenson AB, Lancaster WD, et al. The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. *Hum. Pathol.* 1986; 17: 552-559.
6. Xiao X, Cao M, Miller TR, et al. Papillomavirus DNA in cervical carcinoma specimens from central China. *Lancet* 1988; 2: 902.
7. Werness BA, Lenne AJ, Miller PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
8. Wilczynski SP, Bergen S, Walker J, et al. Human Papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. *Hum. Pathol.* 1988; 19: 697-704.
9. MvLachlin CM, Shen LH, Sheets EE, et al. Disparities in mean age and histopathologic grade between human papillomavirus type-specific early cervical neoplasms. *Hum. Pathol.* 1997; 28: 1226-1229.
10. McCance DJ, Campion MJ, Clarkson PK, et al. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br. J. Obst. Gynecol.* 1985; 92: 1101-1105.
11. Macnab JCM, Walhinshaw JÁ, Cardiner JW, Clements IB. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N. Eng. J. Med.* 1986; 15: 1052-1058.
12. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, et al. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 560-563.
13. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. *Hum. Pathol.* 1990; 21: 686-698.
14. Cooper K, McGee J'O. Human papillomavirus, integration and cervical carcinogenesis: a clinicopathological perspective. *J Clin Pathol: Mol. Pathol.* 1997; 50: 1-3.
15. Winkler B, Capo V, Reumann W, et al. Human papillomavirus infection of the oesophagus. A clinicopathologic study with demonstration of papillomavirus antigen by the immunoperoxidase technique. *Cancer* 1985; 55: 149-155.
16. Andrade LALA, Oyakawa N, Vassallo J. Immunohistochemical demonstration of papillomavirus infection in condylomatous and preneoplastic lesions of the lower female genital tract. *Pathologica* 1991; 83: 301-306.
17. Namkoong SE. Clinical application of HPV typing in cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Obst.* 1995; 49(suppl.): S59-S67.
18. Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obst. Gynecol. Clin. North. Am.* 1996; 23: 707-730.
19. Burnet AF. Prognostic significance of PCR detected human papillomavirus of tumors and lymph nodes in surgically treated stage in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 1992; 47: 343-347.
20. Toon PG, Arrand JR, Wilson LP, Sharp DS. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasms. *Br. Med. J.* 1986; 293: 1261-1264.
21. Wagner D, Ikenberg H, Doehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic and in situ hybridization. *Obst. Gynecol.* 1984; 64: 767-772.
22. Schneider KH, Schulmann R, Gissmann L. Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Br. J. Cancer* 1985; 35: 443-448.

23. Lorincz A. Hybrid capture: a simple, sensitive method for the routine detection of HPV DNA. EUROGIN-European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia 1986; p. 59-62.
24. Zehbe I, Hacker GW, SU H, et al. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-nanogold, and silver acetate autometallography. Detection of single-copy human papillomavirus. *Am. J. Pathol.* 1997; 150: 1553-1561.
25. Barnes W, Delgado G, Kurman RJ, et al. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 1988; 29: 267-273.
26. Herrington CS, Wells M. Can HPV typing predict the behaviour of cervical epithelial neoplasia? *Histopathology* 1997; 31: 301-303.
27. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 1976; 20: 505-509.
28. Lorincz A. Human papillomavirus testing. *Pathology Case Reviews* 1997; 2(1): 43-48.
29. Reid R, Greenberg MD, Lorincz A, et al. Should cervical cytology testing be augmented by cervicography or HPV-DNA detection? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 164: 1461-1469.
30. Carmichael JA. The management of minor degrees of cervical dysplasia associated with the human papillomavirus. *Yale J. Biol. Med.* 1991; 64: 591-597.
31. Schneider A, Kirchhoff T, Meinhardt G, Gissmann L. Repeated evaluation of HPV 16 status in cervical swabs of young women with a history of normal Papanicolaou smears. *Obstet. Gynecol.* 1992; 79: 683-688.
32. Ferenczy A. Viral testing for genital human papillomavirus infections: recent progress and clinical potentials. *Int. J. Gynecol. Cancer* 1995; 5: 321-328.
33. Crum CP. Papillomavirus testing: an opposing view. *Pathology Case Reviews* 1997; 2(1): 49-52.

20. FÍGADO

Venâncio A. F. Alves, Alda Wakamatsu, Raimunda Telma M. Santos, Suely Nonogaki, Cristina T. Kanamura e Luiz C.C. Gayotto

I. HEPATITES POR VÍRUS

A biópsia, além de permitir o estudo do padrão histopatológico, fundamental na avaliação diagnóstica e prognóstica nas hepatites, oferece ainda amostra para a pesquisa de imunorreatividade de antígenos no próprio tecido. O material de biópsia representa uma grande oportunidade de correlacionar a presença de proteínas virais com os índices de lesão dos hepatócitos e a presença das células inflamatórias indicativas da resposta imunológica, sendo a melhor possibilidade de correlação morfológica-imunológica, com a localização precisa da expressão de proteínas virais.

No presente capítulo, serão especialmente discutidas as perspectivas atuais de detecção de antígenos dos vírus das Hepatites B e C. Serão adicionalmente mencionadas as perspectivas de detecção de seqüências de nucleotídeos destes vírus mediante Hibridização Molecular "in situ". Outros marcadores de vírus potencialmente causais de hepatites serão adicionalmente mencionados, mas a caracterização dos padrões de resposta imune do paciente, que também recebe importante contribuição da imuno-histoquímica, não será aqui detalhada.

Hepatite B

O vírus da hepatite B é responsável por um amplo espectro de doença hepática no homem, que inclui as hepatites agudas, crônicas, em seus vários estádios e graus de atividade, cirrose e os portadores assintomáticos. É sabido, também, que o fato de ser portador crônico do VHB, aumenta consideravelmente o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

A partir do descobrimento do antígeno Austrália por Blumberg et al. ⁽¹⁾, grandes avanços no estudo deste vírus foram obtidos, cuja composição está hoje bem caracterizada. É um hepadnaviridae, cujo genoma foi caracterizado como um DNA circular com fita dupla parcial. A fita longa ou L(-) tem uma seqüência de 3200 nucleotídeos. A outra fita S(+) tem extensão variável, que pode corresponder de 50 a 100% da fita longa, onde as extremidades 5' das duas cadeias do DNA se superpõem, mantendo a estrutura circular da molécula ⁽²⁾.

Sua organização genética está razoavelmente determinada e até o presente foram identificadas as diferentes seqüências de nucleotídeos determinantes dos diferentes tipos de AgHBs. A fita longa apresenta 4 regiões codificadoras (S,C,P e X). Estas seqüências apresentam locais fixos de inserção na molécula de DNA, sendo responsáveis por toda a capacidade codificadora do vírus. A região S contém o gene S, bem como as fases de leitura aberta pré-S1 e pré-S2. É responsável pela codificação da proteína principal do envelope (AgHBs), que pode ter 389 (ay) ou 400 (ad) aminoácidos ⁽²⁾.

A região pré-S2 é considerada o epítopo dominante e é a mais imunogênica. É também o receptor para albumina sérica humana polimerizada, sendo postulado que esta substância media a entrada do VHB no hepatócito.

A região C relaciona-se com a síntese do principal polipeptídeo do "core", que contém o AgHBc e uma proteína solúvel (AgHBe), produzida pela clivagem do amino-carboxi-terminal da proteína precursora, codificada pelo gene pré-core. A região P codifica a DNA polimerase, que possui a atividade de transcriptase reversa, responsável pela replicação do DNA do vírus e a região X codifica um polipeptídeo de 145 a 154 aminoácidos com função de transativação da transcrição, regulando a expressão de determinados gens do próprio vírus ou da célula hospedeira e reage com anticorpos sintéticos correspondentes a essa região ⁽³⁾.

Para os vírus como o VHB, que não se replicam em culturas celulares convencionais, o desenvolvimento e utilização de diversas técnicas imunológicas e de biologia molecular ⁽⁴⁾, aplicadas ao diagnóstico e acompanhamento das doenças hepáticas, têm contribuído para o estudo dos eventos relacionados à replicação viral e dos diversos modelos de patogênese. Permitem ainda correlacionar a distribuição do ácido nucleico com a dos diversos antígenos, assim como as diferentes alterações histológicas e a evolução clínica ^(4,5).

A infecção pelo VHB em adultos e jovens pode evoluir para cronicidade em aproximadamente 3% dos casos, mas quando tal infecção acomete recém-nascidos o índice de cronificação é muito elevado, sendo até 90% conforme relatado no Extremo Oriente.

Os diversos padrões morfológicos das hepatites podem ser observados na HB e o aspecto mais sugestivo desta etiologia é o encontro, às colorações habituais, do "hepatócito com citoplasma em vidro fosco" (ground glass hepatocyte), correspondendo a grandes acúmulos de envelope do vírus nos hepatócitos ⁽⁶⁾.

AgHBs

A identificação etiológica da infecção pelo VHB pode ser feita de modo específico pela detecção do AgHBs no citoplasma ou membrana de hepatócitos: Inicialmente descrita mediante imunofluorescência em amostra hepática congelada ⁽⁷⁾, foi, a seguir, obtida por métodos imuno-histoquímicos com diversos sistemas de amplificação, como por exemplo PAP ⁽⁸⁾ ou ABC ⁽⁹⁾, aplicáveis inclusive em amostras fixadas rotineiramente em formalina tamponada e incluídas em parafina. Tal antígeno não é habitualmente detectável nas **hepatites agudas**, quando apenas raros hepatócitos podem mostrar positividade citoplasmática ou em membrana, coerente com a idéia de Gudat et al. de que as formas agudas são de plena eliminação de proteínas virais ⁽¹⁰⁾.

Em seu extremo, as formas de **necrose submaciça ou maciça** ("fulminantes") corresponderiam a resposta imune tipo hipersensibilidade, tendo Silva et al., entre nós, comprovado a imunorreatividade para AgHBs em apenas raras células de um dentre 7 casos de necrópsia ⁽¹¹⁾. Em **hepatites prolongadas**, em formas de transição para cronicidade, nota-se progressivo aumento da imunorreatividade de hepatócitos para os antígenos virais, como o AgHBs e AgHBc, aspecto importante na avaliação prognóstica e na decisão da oportunidade para instalação de terapia anti-viral nestas condições.

Nas **hepatites crônicas**, a comparação da distribuição de antígenos do VHB com o padrão histológico permitiu a Gudat et al. ⁽¹⁰⁾ e Chu et al. ⁽¹²⁾, a proposição de formas ou, mais provavelmente, fases de diferente predomínio da replicação viral ou da resposta do hospedeiro, como parte da história natural da infecção:

1. Replicação viral elevada, baixa resposta imune, inflamação mínima.

2. Replicação baixa, resposta imune-mediada por linfócitos T eliminando antígenos partículas virais, inflamação ativa.
3. Replicação baixa / ausente, inflamação mínima, DNA viral integrado ao genoma do hepatócito. Na década passada, diversos estudos com amplificação pelo sistema PAP detectaram positividade para este marcador em 70 a 77% dos casos ^(13,14). Não foi encontrada qualquer correlação da expressão tecidual do AgHBs com os marcadores de replicação, havendo demonstração da produção deste antígeno, mesmo em casos com o genoma viral já integrado ao do hepatócito.

Recentemente, devido à necessidade de relacionar a distribuição dos antígenos aos novos critérios de classificação das hepatites crônicas e diante dos aprimoramentos técnicos relacionados desde a fixação mais cuidadosa em formol tamponado por aproximadamente 12-24 hs, até o desenvolvimento de novos anticorpos, visando também à comparação do PAP com o ABC como sistemas de amplificação, estudamos 42 casos de biópsias hepáticas de pacientes soropositivos para AgHBs. A pesquisa de AgHBs com amplificação pelo método PAP resultou positiva em 36/42 (85,7 %) dos casos de infecção crônica pelo VHB, enquanto todos os 42 casos mostraram-se positivos para este marcador pelo método ABC ⁽¹⁵⁾.

Os dois sistemas permitiram o encontro de reatividade citoplasmática, global ou segmentar, sendo ainda encontrado, ao método ABC, padrão de reatividade em membrana de hepatócitos. As demais células estiveram sempre negativas para o AgHBs. Tais achados são similares aos de WU et al. ⁽¹⁶⁾, que tiveram reação positiva em 105/114 casos, com 92% de positividade nas hepatites crônicas pelo VHB.

Índices de detecção tão altos para AgHBs tornam esta reação uma alternativa válida para a própria identificação da etiologia das hepatites crônicas. Este ponto pode ser de máxima utilidade em casos em que a presença de lesão só é constatada no estudo necroscópico, geralmente não mais havendo disponibilidade de amostra para estudos sorológicos.

Usando anticorpos monoclonais, verifica-se que, em pacientes virêmicos, as formas predominantes de AgHBs em hepatócitos são a "pequena" (apenas o produto do gene S) e a "média", contendo os produtos dos genes S e pré-S2. Por outro lado, em não-virêmicos, predomina a molécula "grande", contendo os produtos dos genes pré-S1, pré-S2 e S, associada com o aspecto histológico de "hepatócito em vidro fosco". O acúmulo de grande quantidade de moléculas pré-S1 inibiria a secreção do AgHBs, associando-se, a baixos níveis séricos de HBs.

AgHBc

Outro antígeno cuja detecção é de grande utilidade é o AgHBc . Sua expressão é preferencialmente nuclear. Quando a replicação viral é muito elevada, o AgHBc pode ser adicionalmente detectado no citoplasma de hepatócitos. Nas fases mais avançadas da infecção, com integração do genoma viral ao do hepatócito, deixa de ocorrer a expressão do gene da região C ⁽¹⁷⁾.

No estudo de Santos et al. ⁽¹⁵⁾, a expressão de AgHBc nuclear ocorreu em 26/42 casos (61,9%) pelo método PAP superando resultados anteriores de nosso próprio laboratório ⁽¹⁴⁾, quando obtivemos positividade em 45% dos casos. HSU et al. (1988) obtiveram 49,5% de positividade pelo método PAP. Nossos resultados com amplificação pelo ABC mostram positividade para AgHBc em 29/42 casos (69 %), números muito similares aos de WU et al. ⁽¹⁶⁾ com positividade de 66,5% pelo mesmo método de

amplificação. Os dois sistemas permitiram o encontro de reatividade nuclear, sendo ainda encontrado, ao método ABC, padrão de reatividade em citoplasma de hepatócitos.

Importa ressaltar, nos diversos estudos ^(14,15,16,17), a marcante associação entre a positividade imuno-histoquímica para AgHBc e outros marcadores de replicação viral. Santos et al. ⁽¹⁵⁾ constataram que o AgHBc está presente em maior quantidade nos pacientes com as fases de maior atividade necro-inflamatória e mostrando o vírus em plena atividade de replicação.

Um debate importante é a possibilidade quanto à especificidade dos métodos imuno-histoquímicos, especialmente quanto à detecção do AgHBc no citoplasma de hepatócitos.

Van Den Oord et al. ⁽¹⁸⁾ descreveram a afinidade de ligação da biotina com AgHBs, podendo ocorrer uma interpretação de resultados falso-positivos, através de ligação do anticorpo secundário biotilado. Essa reação com biotina pode ocorrer pela presença de pontes dissulfeto no AgHBs, ou pela existência de receptores para biotina na membrana plasmática dos hepatócitos.

Outro achado significativo é o de Omata et al. ⁽¹⁹⁾, mostrando ligação não-imunológica de peroxidase livre com hepatócitos contendo AgHBs. A exata natureza dessa ligação não está clara, mas é possível que grupos aldeídos derivados da oxidação do componente carboidrato da peroxidase, liguem-se a aminogrupos livres do tecido, incluindo possivelmente, o AgHBs.

Além dos receptores para biotina, o AgHBs também pode expressar receptores para soroalbumina polimerizada e fibrinogênio.

No nosso estudo mais recente ⁽¹⁵⁾, casos com áreas de alta concentração de AgHBc citoplasmático pelo método ABC mostraram-se negativos na mesma área para pesquisa de AgHBs, confirmando a especificidade da reação. Além disso, os controles negativos também evidenciaram resultados satisfatórios, possibilitando essa análise comparativa entre os métodos, já que, sem o anticorpo primário, nenhum componente de anticorpo secundário, complexo de amplificação ou substrato cromógeno induziu, nesta amostra, reação espúria.

AgHBe

A detecção sérica do AgHBe geralmente está relacionada à viremia, mas sua síntese não parece necessária para a replicação viral, já que existem variantes do VHB incapazes de expressar o AgHBe, devido a mutações na região pré-core ("variantes e-minus"), que são capazes de replicar, estando, inclusive, relacionadas a algumas formas graves de hepatite B. Em cortes em criostato, Trepo et al. ⁽²⁰⁾ relataram seu encontro no citoplasma de hepatócitos infectados, enquanto Mondelli et al. ⁽²¹⁾, citam sua detecção no núcleo. Só muito recentemente estes achados foram confirmados em material fixado em formol e incluído em parafina. Villari et al. ⁽²²⁾, detectaram AgHBe em 16/18 casos de HCA com cepas selvagens de VHB, mas em nenhum dos 9 casos infectados apenas com "variantes e-minus". Dentre os 16 casos positivos à imuno-histoquímica, 8 mostraram reatividade apenas no núcleo de hepatócitos, 7 no núcleo e no citoplasma e 1 apenas no citoplasma. Esses autores sugerem que esta determinação imuno-histoquímica possa contribuir na avaliação diagnóstica e prognóstica, auxiliando a discriminar entre infecções por cepas selvagens do VHB e cepas "e-minus", potencialmente mais graves e com menor índice de resposta terapêutica a antivirais.

Um achado bastante valorizado nos estudos de patogenia da Hepatite B é que, apesar da positividade imuno-histoquímica para AgHBe e da reatividade membranosa para AgHBs mostrarem-se associadas a elevadas taxas de replicação viral, não se comprova sua relação com o grau de atividade da doença. Estes fatos reforçam o conceito de que o grande alvo da resposta imune mediada por linfócitos T CD8+, e conseqüentemente, a lesão hepatocitária, é dirigida a epítomos de AgHBc não correspondentes às sequências do AgHBe. Naoumov & Eddleston, 1994, detalham ainda mais este mecanismo, informando que a resposta de linfócitos T CD8+ dirige-se a oligopeptídeos da região core que são apresentados em pregas de macromoléculas de HLA-tipo I expressas na superfície celular.

AgHBx

A transativação de genes celulares e a inativação do anti-oncogene p53 pela proteína X do VHB são propostas como possíveis mecanismos de indução de carcinoma hepatocelular (CHC), mas as tentativas de sua detecção mostram resultados variáveis. Para superar tais inconsistências, Su et al., 1998 compararam os resultados de onze anticorpos, oriundos de cinco laboratórios. Destes, apenas um anticorpo policlonal e dois monoclonais exibiram reação imuno-histoquímica específica para AgHBx, permitindo sua identificação no citoplasma de hepatócitos em 53% de casos de cirrose e 59% de CHC. Segundo esses autores, o significado da imuno-expressão do AgHBx na hepatocarcinogênese ainda precisa ser melhor compreendido.

Detecção do genoma viral por Hibridização molecular "in situ" (HIS)

A detecção de seqüências do genoma do VHB por HIS em tecido hepático humano naturalmente infectados foi descrita primeiramente por Gowans et al. ⁽⁴⁾ e a seguir por vários investigadores, usando sondas conjugadas com substâncias radioativas, biotina e, mais recentemente, oligoxigenina ⁽²³⁾, biotina.

O uso da HIS para caracterizar seqüências de DNA do VHB em células individuais e sua associação aos padrões histológicos, pode contribuir para maior compreensão da patobiologia da infecção e persistência do vírus.

A nível celular, a presença de DNA replicativo do VHB no citoplasma, está amplamente associada com a expressão de AgHBc no tecido (particularmente citoplasmático) e AgHBe no soro ^(19,24).

Usando sondas biotiniladas, Naoumov et al. ⁽²³⁾ obtiveram 22,5% (7/31 casos) de positividade e, recentemente, entre nós, Santos et al. ⁽²⁵⁾ detectaram DNA do VHB em 35,7% (15/42) dos casos de infecção crônica pelo VHB.

Ainda hoje, entretanto, as técnicas de HIS requerem uso de sondas muito concentradas, diferente das elevadas diluições de anticorpos biotinilados empregados na imuno-histoquímica. Por isto, uma tendência em HIS em tecido hepático é o uso de sondas marcadas com digoxigenina, com sinal amplificado mediante fosfatase alcalina. Usando tal metodologia, Santos et al. ⁽²⁵⁾ detectaram positividade em 7/39 casos (17,9%) de infecção crônica pelo VHB, com reatividade citoplasmática nos 7 casos, 5 dos quais também exibindo reatividade no núcleo de hepatócitos.

Lau et al. ⁽²⁶⁾, detectaram DNA do VHB em material parafinado com sondas marcadas com digoxigenina em todos os pacientes com AgHBe no soro (13/13), mostrando alta sensibilidade e especificidade, não sendo detectado nos pacientes com

anti-HBe no soro. Em nosso material obtivemos uma positividade inferior, mas bastante específica, pois todos os casos corados, também eram positivos para AgHBe. Também demonstramos associação significativa entre a positividade para DNA-VHB mediante HIS e para AgHBc mediante imuno-histoquímica que, a nosso ver, ainda hoje é o método anátomo-patológico de escolha para caracterizar a replicação viral ⁽¹⁵⁾.

Hepatite Delta

A co-infecção e, em especial, a superinfecção por vírus da Hepatite Delta (VHD) em portadores do VHB é relacionada à maior gravidade das hepatites agudas, como também à maior progressão para a cronicidade ⁽²⁷⁾. Tais quadros têm habitualmente maior atividade necro-inflamatória, sendo também mais freqüente e rápido o desenvolvimento de cirrose.

Ainda que alguns aspectos histológicos, como a presença de hepatócitos com degeneração acidofílica ou com núcleos aumentados, hiper cromáticos circundados por citoplasma com esteatose microgoticular (células "em mórula" ou "em aranha") sejam achado freqüente na hepatite Delta, não são considerados patognomônicos.

Fundamental para a caracterização etiológica é a pesquisa, por métodos imuno-histoquímicos, do antígeno Delta ^(27,28,29). Paralelo à expressão da nucleoproteína AgHD é o encontro de RNA do VHD em núcleos de hepatócitos, sendo estes dois achados correlacionados com replicação ativa deste vírus ⁽³⁰⁾. Pacchioni et al. ⁽³¹⁾, encontraram especial positividade do RNA viral em núcleos "arenosos" (sanded nuclei) com inclusão acidofílica ocupando o centro de núcleos de hepatócitos, ficando a heterocromatina e o nucléolo na periferia. Tais autores consideram que tal padrão morfológico nuclear seja evidente apenas nos casos com replicação viral mais acentuada ^(30,31).

Hepatite C

As alterações histológicas das hepatites não-A, não-B (HNANB) foram descritas em diversos trabalhos na década passada ⁽³²⁾. Nestas hepatites, nota-se uma ampla superposição entre as alterações próprias das fases aguda e crônica, havendo evidência de que durante muito tempo coexistam em equilíbrio alterações lobulares e portais. Nesse sentido, a definição morfológica de cronicidade, obedeceria a critérios diferentes nas hepatites B e não-A, não-B.

Com o surgimento de provas sorológicas para determinação de anticorpos anti-proteínas estruturais ou não-estruturais do vírus da hepatite C (VHC), verificou-se que a vasta maioria dos casos de HNANB de transmissão parenteral e uma proporção significativa dos casos esporádicos têm participação etiológica deste vírus ⁽³³⁾.

De outra parte, constatam os estudos publicados até agora uma enorme variabilidade de resultados, atribuível, principalmente à amostragem, aos métodos de fixação e aos anticorpos usados. Os estudos iniciais, tinham predomínio de seleção de amostras congeladas, sabidamente pouco prático na rotina diária. Outra causa de variabilidade são os métodos de amplificação, desde a imunofluorescência indireta (seguramente um método menos sensível dentre os vários aqui testados), avidina-biotina-peroxidase (o mais sensível, com risco potencial da falsa positividade devido à biotina endógena), e o método da peroxidase-anti-peroxidase, que mesmo oferecendo um pouco menos de sensibilidade que a avidina-biotina, mostra-se muito superior à imunofluorescência e é um método bastante razoável para as imunolocalizações,

especialmente em material parafinado. Não usando qualquer reagente marcado, tem a vantagem de não introduzir causas de falsa-positividade. Por último, talvez a razão maior da variabilidade de determinações seja a seleção de antígenos que servirão como alvo da reação imuno-histoquímica.

Desde antes da caracterização do vírus da Hepatite C, vários trabalhos, partiram de soro total de humanos infectados pelo vírus NANB, abordagem até hoje preconizada pelo grupo de virologia de Krawczynsky no CDC ⁽³⁴⁾, usando soro total humano. Esta abordagem permite a detecção de várias proteínas reconhecidas pelos vários anticorpos da resposta imunológica deste indivíduo infectado, mas não a caracterização de qual das proteínas virais está sendo aí identificada. No outro extremo, temos trabalhos, como os da equipe de Hiramatsu et al. ⁽³⁵⁾, utilizando anticorpos monoclonais contra proteínas das várias regiões do genoma viral, com significativa perda da sensibilidade, visto que cada monoclonal tem afinidade por apenas um epítipo. É preciso lembrar que o vírus da Hepatite C é reconhecidamente pobre em expressão de proteínas virais, tanto que para o diagnóstico sorológico é necessária a identificação de anticorpos séricos, sendo muito baixa a antigenemia.

Mais recentemente, tem sido desenvolvida uma estratégia de seleção de antígenos a detectar que nos parece a mais alvissareira dentre as já descritas: caracterizam-se, inicialmente, regiões antigênicas de importância nas várias sedes das regiões do vírus da Hepatite C e, a partir daí, sintetizam-se sequências de amino-ácidos. Com estes conhecimentos, são sintetizados peptídeos imunogênicos, que, isolados ou em soluções, são inoculados em animal altamente responsivo, como o coelho, purificando-se, então anticorpos policlonais específicos contra algumas das regiões.

A Tabela II apresenta os trabalhos referindo detecção de antígenos do VHC em material fixado em formol e incluído em parafina, seguramente a amostra mais adequada para a colheita de biópsia no dia a dia de qualquer centro médico. Com este tipo de amostra, a estratégia com amplificação por qualquer dos métodos imuno-histoquímicos, preferencialmente imunoperoxidase indireta ou peroxidase-anti-peroxidase, não trazendo ao meio a avidina, potencialmente capaz de interagir com a biotina endógena. Diversos autores, especialmente a partir de 1993, têm trabalhado com anticorpos policlonais dirigidos contra polipeptídeos sintéticos e cada vez mais selecionam a região do "core" do VHC para essa determinação. Os índices ainda variam muito entre as determinações, mas a positividade nas hepatites crônicas tem variado de 30 a 70% na maioria das publicações.

No Laboratório de Imuno-histoquímica do Instituto Adolfo Lutz e no LIM-14/HC-FMUSP, temos trabalhado em conjunto com a Divisão de Pesquisas em Virologia do Laboratório Innogenetics, Ghent, Bélgica, cuja equipe obteve treze anticorpos selecionados a partir da caracterização das várias regiões do genoma, seguindo-se a síntese de peptídeos sintéticos de cada área bem caracterizada e sua inoculação em animais. Estudamos, até agora, 6 anticorpos produzidos em camundongos, todos resultando em reações negativas em nossa pesquisa imuno-histoquímica. Dentre os produzidos em coelho, um anticorpo anti-E1 (Rb 347), um anticorpo anti-NS4 (Rb 228) e o anticorpo Rb 246 dirigido contra regiões do core do VHC implicaram em reações bastante promissoras sob o ponto de vista de técnicas imuno-histoquímicas.

Inicialmente, o resultado positivo com o anticorpo dirigido contra a região E1, revelou a proteína E1 em número relativamente pequeno de hepatócitos com uma resolutividade, contraste positivo/fundo muito adequada. A positividade é citoplasmática ora em padrão granuloso, ora em padrão mais difuso. Entretanto, apesar de reação com excelente contraste positivo/fundo e o padrão de granularidade descrito inclusive em

amostras congeladas pelos autores anteriores, temos que lembrar que a região do E é uma região pouco conservada ao longo dos diferentes genótipos e, na nossa casuística ainda são poucos os casos que temos informação de qual é o genótipo viral em determinado caso biopsiado. Nesse sentido, como os nossos anticorpos foram todos produzidos a partir da sequência de VHC de genótipo 1, é importante estudarmos sequências peptídicas de máxima conservação entre os genótipos, de modo que, qualquer que seja o genótipo do vírus no caso biopsiado, não tenhamos perda de reatividade. Por esse motivo, apesar de reação tão bem contrastada, não priorizamos no momento o estudo da proteína E1 em imuno-histoquímica.

Quando utilizamos anticorpos dirigidos contra a região NS4, tivemos reação positiva, mas aqui o contraste positivo/fundo não se mostrou de todo satisfatório. Esse anticorpo tem perspectivas de purificação, mas, nesse momento, não oferece condições de aplicação imediata em biópsias vistas ao estudo imuno-histoquímico.

Desde os estudos preliminares de Choo et al. ⁽³⁶⁾ e Okamoto et al. ⁽³⁷⁾ no início desta década, verificou-se que, depois da região 5', o "core" do VHC é a região mais conservada ao longo de todo o genoma, sendo que, nos vários isolados estudados das várias origens geográficas, sempre a homologia da região "core" supera os 91%.

Os estudos de padronização levaram à seleção do anticorpo anti-core Rb 246, com reatividade para epitopos das regiões 3 (aa 13-32), 7 (aa 37-56) e 9 (49-68) do core do VHC. A amplificação foi obtida pelo sistema peroxidase-anti-peroxidase ⁽³⁸⁾.

O estudo dos primeiros 50 casos de infecção crônica pelo VHC em material fixado em formol e incluídos em parafina, mostrou positividade em 27 destes casos, (54%), apresentando o mesmo padrão descrito por Krawczynsky et al. ⁽³⁴⁾ de padrão granular, citoplasmático, com preferência à distribuição sub membranosa. Muitos desses casos apresentavam qualitativamente uma preferência de células positivas nas áreas de NSB, áreas exatamente onde os linfócitos estão envolvendo hepatócitos que parecem estar evoluindo para a morte ⁽³⁸⁾.

A ampliação do estudo para 180 casos permitiu a detecção do Ag core em 62 (34,4%). Ainda que menos sensível, a detecção imuno-histoquímica do Ag core mostrou associação significativa com a detecção do RNA-VHC no soro desses pacientes por PCR, sugerindo sua utilidade como marcador de replicação viral. A detecção do antígeno core mostrou-se também relacionada ao estadiamento histológico e ao grau de necrose periportal e, inversamente, com os fenômenos lobulares. Estes achados podem sugerir uma eficiência parcial da atividade necro-inflamatória lobular na eliminação de antígenos virais. Por outro lado, a persistência de antígenos virais em hepatócitos sofrendo "necrose em saca-bocados" indicaria uma ineficiência desta forma de resposta imune do hospedeiro na eliminação de antígenos virais ⁽³⁹⁾.

No presente momento, questões metodológicas ainda não indicam esta determinação com o objetivo de diagnóstico etiológico. Os achados imuno-histoquímicos, entretanto, já se mostram promissores para análise de interesse patogenético.

Adenovírus

Além de infecções em vias respiratórias e olhos, raros surtos de hepatite já foram associados a adenovírus. Mais importante é o acometimento de pacientes imunossuprimidos, podendo resultar em microabscessos ou necrose extensa de hepatócitos em quadro muitas vezes fatal em pacientes transplantados ou portadores de AIDS ⁽⁴⁰⁾.

○ aspecto mais característico é a inclusão intranuclear anofílica ou eosinofílica, por vezes similar à dos vírus herpes simples ou citomegalovírus.

Além do diagnóstico mediante cultura para vírus, Dombrowsky et al. ⁽⁴¹⁾, Saad et al. ⁽⁴⁰⁾ e Yan et al. ⁽⁴²⁾ referem bons resultados através da detecção imuno-histoquímica em amostras hepáticas fixadas em formol.

Febre Amarela

A análise histopatológica de amostra hepática colhida pós-morte é, ainda um dos principais métodos para o diagnóstico da Febre Amarela, ainda que os critérios histológicos não sejam mais considerados patognomônicos ⁽⁴³⁾.

Recentes estudos detectaram antígenos virais em hepatócitos humanos através da imunofluorescência, com uso de soro de macacos ⁽⁴⁴⁾ ou por técnicas de imunoperoxidase, com soros humanos ⁽⁴⁵⁾.

Em nosso laboratório, De Brito et al. ⁽⁴⁶⁾ desenvolveram um método imuno-histoquímico usando soros imunes de coelhos e *hamsters*, bem como líquido ascítico hiperimune de camundongos, com amplificação pelo sistema avidina-biotina-peroxidase. Sua aplicação em material de necrópsia permitiu detecção de antígeno viral no citoplasma de hepatócitos morfológicamente preservados, em corpúsculos de Councilman e em células de Kupffer. Também constatou-se reação no epitélio de túbulos renais e em fibras miocárdicas, compondo dados sugestivos da existência de focos adicionais de replicação viral. Estes resultados são encorajadores, quanto à aplicação desta metodologia na elucidação etiológica de icterícias febris, quer em biópsias, quer em estudos pós-morte com aplicação em saúde pública.

Citomegalovírus

Infecções sistêmicas por citomegalovírus são uma das mais freqüentes complicações infecciosas em várias formas de imunodepressão, incluindo-se AIDS e transplante de órgãos, sendo o fígado um dos órgãos mais comumente envolvidos ⁽⁴⁷⁾.

Anticorpos monoclonais permitem detecção de proteínas de expressão precoce no ciclo viral (early antigens), no núcleo de hepatócitos com ou sem inclusão viral morfológicamente evidente e anticorpos policlonais reagem com proteínas de expressão precoce e com as de expressão tardia (late antigens) no núcleo ou no citoplasma de hepatócitos ⁽⁴⁸⁾. Paya et al. obtiveram 84% de sensibilidade e 90% de especificidade com o uso deste anticorpo monoclonal, enquanto o anticorpo policlonal resultou em 72% de sensibilidade e 97% de especificidade ⁽⁴⁸⁾. A diferença de positividade é atribuída à variação da expressão de proteínas nas diversas fases de infecção, destacando-se a grande utilidade da aplicação do anticorpo monoclonal no diagnóstico precoce da hepatite por CMV.

II. TUMORES HEPÁTICOS

A apresentação clínica de tumores no fígado é muito freqüente, sendo uma questão médica de importância crescente até pelo uso cada vez mais difundido dos modernos métodos de imagem.

Dentre os diversos tipos de tumores detectados no fígado, destacam-se as neoplasias malignas, primárias ou metastáticas que, juntas, compõem uma fração importante das causas de morte por câncer em todo o mundo.

Em diversas ocasiões, o diagnóstico histopatológico das neoplasias hepáticas é difícil, quer pela dificuldade de identificação de linhagens de diferenciação em tumores anaplásicos, quer na adequada identificação de órgãos de origem dos muito freqüentes adenocarcinomas com manifestação clínica inicial por meio de metástases hepáticas, conforme discutido no capítulo 3.

No presente capítulo, a partir da análise do padrão de desenvolvimento embriológico das principais estruturas hepáticas, faremos um estudo dos principais tumores primários do fígado com base nos perfis imuno-histoquímicos mais habituais.

Desenvolvimento embriológico do fígado

A primeira estrutura embrionária reconhecida como precursora do fígado é o "divertículo hepático", que se origina do revestimento endodérmico do intestino anterior ao redor da 3-4 semana de gestação⁽⁴⁹⁾. Sua diferenciação cranial dá origem às trabéculas hepáticas, enquanto, no sentido caudal, formam-se os ductos biliares extra-hepáticos e a vesícula biliar.

Ao longo da 5ª semana, as trabéculas hepáticas primitivas crescem permeando o mesênquima do septo transversal, onde também prolifera o plexo capilar que se origina das veias vitelinas, dando origem aos sinusóides hepáticos primitivos⁽⁵⁰⁾. Durante as 7 primeiras semanas, não se identificam no embrião ductos biliares intra-hepáticos⁽⁵⁰⁾. Seu desenvolvimento seria associado aos ramos venosos portais, mas tal hipótese ainda é motivo de debates. A teoria "hepatocitogênica" defende que os ductos biliares intra-hepáticos originem-se de hepatócitos ao redor de ramos da veia porta⁽⁵¹⁾. A hipótese "ductal" atribui sua origem a uma projeção intra-hepática do epitélio de ductos biliares primitivos⁽⁵²⁾, havendo ainda os que tentam conciliar ambas as hipóteses⁽⁵⁰⁾. A primeira hipótese, "hepatocitogênica", é a mais aceita, já que alguns estudos demonstraram a presença de glicogênio, glicose-6-fosfatase, albumina e alfa-fetoproteína, marcadores hepatocelulares, em ductos biliares intra-hepáticos primitivos⁽⁵³⁾.

Várias evidências apontam para a formação, ao redor da 5ª - 6ª semana de gestação, da "placa ductal": inicialmente, a camada de hepatócitos em contato com o mesênquima ao redor de ramos venosos portais, transforma-se em células de tipo biliar. A seguir, uma segunda camada transforma-se em epitélio biliar, resultando em uma fenda circular que assume um padrão cilíndrico em torno do ramo venoso portal e do tecido conjuntivo circunjacente. Depois, esta "placa" sofre remodelação gradual, formando o sistema biliar intra-hepático, que se anastomosa com os canais de Hering, interligando os ductos biliares portais com os canalículos biliares, estruturas especializadas no "polo biliar" dos hepatócitos⁽⁵⁴⁾.

Alguns autores analisaram este desenvolvimento embrionário através da pesquisa imuno-histoquímica de citoqueratinas individuais^(55,56,57,58), merecendo destaque a abordagem do grupo belga liderado por Desmet⁽⁵⁵⁾. Esses autores demonstraram que as

células epiteliais no fígado em desenvolvimento apresentam CK8 e 18 desde o início de sua detecção embrionária. Quando a "placa ductal" passa a apresentar esboço de lume, inicialmente no hilo hepático, estendendo-se inicialmente aos espaços-porta maiores e depois em todo o fígado, passa a expressar também a ck19, o que também foi demonstrado em hepatócitos primitivos, desde a 4ª até a 12ª semana^(57,58). À partir da 12ª -14ª semana embrionária, os hepatócitos expressam apenas ck8 e 18, enquanto o epitélio da "placa ductal" mostra imunorreatividade para CK8, 18 e 19. A citoqueratina 7 só é detectável a partir da 20 semana de gestação, inicialmente nos ductos biliares maiores e, só posteriormente, nos menores e em células da "placa ductal". Van Eyken et al.⁽⁵⁵⁾ consideram que tais achados corroboram a teoria "hepatocitogena" da origem dos ductos biliares intra-hepáticos, que, maduros, exibem CK7 e 19, além das CK8 e 18, também próprias de hepatócitos. Esse autor não exclui, entretanto, a possibilidade de que as células epiteliais primitivas do fígado constituam um precursor "bipotencial".

Outro importante achado desses trabalhos^(55,57,58) é que, em geral, o desenvolvimento dos ductos biliares ainda não está completo ao nascimento, sendo que os ramos venosos portais mais distantes do hilo hepático ainda podem ser vistos circundados por uma placa ductal incompleta, com expressão de CK 7 menos exuberante que a detectada no fígado adulto. Estes dados explicam o achado de Kahn et al.⁽⁵⁹⁾, relatando um aumento progressivo da relação entre o número de ductos biliares e o de espaços-porta em paralelo à idade gestacional.

Carcinoma hepatocelular

Filamentos intermediários – citoqueratinas

As células epiteliais adultas normais do fígado apresentam uma composição bastante simples de citoqueratinas^(55,57): os hepatócitos expressam apenas o par 8/18 e o epitélio biliar expressa as citoqueratinas 7/19/8/ 18.

O carcinoma hepatocelular (CHC), mesmo em suas formas mais anaplásicas, tende a reproduzir o imunofenótipo de hepatócitos normais, exibindo reatividade apenas com CK8 e CK18. Este par de CK é o mais encontrado em praticamente todos os epitélios glandulares normais ou neoplásicos, mas, em geral, acompanhados de imunexpressão de várias outras citoqueratinas, habitualmente não detectáveis nas lesões hepáticas.

Em proporções que variam de 3,2% a 25,6%^(60,61,62,63), os CHC podem apresentar reatividade para CK7 ou para CK 19, geralmente em ocasionais células, isoladas ou formando cordões na interface do parênquima neoplásico com septos fibrosos. Tal achado poderia significar:

1. a metaplasia ductular de hepatócitos, à semelhança do que ocorre em diversos processos patológicos hepáticos não neoplásicos⁽⁶⁴⁾.
2. a gênese do carcinoma hepatocelular a partir de células-mãe ("stem cells") com potencialidade de diferenciação tanto para hepatócitos como para epitélio ductular. Estas "stem cells" ou "células ovais", podem ser induzidas por carcinogênese química em ratos⁽⁶⁵⁾ e expressam CKs 7, 8, 18 e 19. Em carcinomas hepatocelulares humanos, Hsia et al.⁽⁶⁶⁾, caracterizaram morfológicamente células relativamente pequenas, de núcleos ovais, com citoplasma pálido, que apresentam reação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal OV-6, anti- células ovais de CHC de rato, além de intensa imunorreatividade para CK19. Tais células foram proeminentes na periferia dos carcinomas, e em metade de sua casuística (7/14 casos) CK19 foi também detectada em células neoplásicas.

As diferenças entre os diversos trabalhos, segundo Van Eyken e Desmet ⁽⁶⁷⁾, devem-se à perda da imunorreatividade devida à fixação ou não capacidade de diferentes anticorpos usados para reagir com tecido fixado em formol e incluído em parafina. Nossa avaliação é que, além destes fatores, aspecto importante é a sensibilidade do sistema de amplificação, sendo o ABC que aqui utilizamos consideravelmente mais sensível que o PAP.

Outras CK de baixo peso molecular, em especial a CK20 não são habitualmente detectáveis em CHC, o mesmo ocorrendo com as CK de alto PM ^(63,92). Na prática diagnóstica, portanto, a positividade de determinado carcinoma para CK8 e para CK 18, e a negatividade (ou reatividade apenas focal) para CK7 e CK19, são importantes critérios do painel a ser usado no diagnóstico diferencial destas neoplasias.

Além das citoqueratinas, a pesquisa dos demais filamentos intermediários é extremamente útil no estudo de neoplasias indiferenciadas. Dentre estes, a Vimentina mostra-se positiva na virtual totalidade dos sarcomas, linfomas e em um sub-grupo de carcinomas que inclui principalmente os de rim, endométrio e tireóide. Em alguns carcinomas, como os de mama, sua positividade relaciona-se a pior prognóstico, geralmente em tumores mais anaplásicos. Em CHC tal pesquisa é geralmente negativa, e, em nosso laboratório, Peroco ⁽⁶⁸⁾ detectou vimentina em apenas 1 CHC com alto grau de indiferenciação dentre 114 casos. As reações para os demais filamentos intermediários tem-se mostrado negativas nos CHC.

Proteínas oncofetais – Antígeno carcinoembriônico e alfafetoproteína

Denominam-se proteínas oncofetais diversas proteínas ou glicoproteínas encontradas em algumas fases de desenvolvimento embrionário, mas não nos tecidos adultos. Algumas destas têm sido demonstradas em células neoplásicas, sendo por vezes exportadas para o soro, servindo como marcadores diagnósticos e de acompanhamento evolutivo após tratamento.

Dentre elas, destaca-se a família do antígeno carcino-embriônico (CEA), que inclui, entre outras, o próprio CEA e a glicoproteína biliar – 1 (BGP-1).

O anticorpo monoclonal A5B7 anti-CEA desenvolvido por HARDWOOD et al. ⁽⁶⁹⁾ dirige-se a epitopo de grande relevância e especificidade no antígeno carcinoembriônico. Os CHC são geralmente negativos para este marcador. Em nosso laboratório, encontramos reatividade para este anticorpo monoclonal anti-CEA em apenas 1 dentre 114 CHC ⁽⁷¹⁾. Tal negatividade é atribuída à especificidade deste anticorpo monoclonal, que não reconhece a glicoproteína biliar-I (BGP-I) que é um membro da família CEA presente nos canalículos biliares do tecido hepático normal e neoplásico. Por outro lado, o uso, ainda hoje amplamente difundido, de anticorpos policlonais anti-CEA, que também reagem com a BGP-1, como o produzido por PRIMUS et al. ⁽⁷²⁾, resulta em elevada positividade em numerosos casos de CHC, além de muitos outros adenocarcinomas, especialmente nos de origem endodérmica. Mais ainda, quando se identifica positividade em membrana de células neoplásicas, delineando canalículos biliares, esta reação mostra-se também muito específica.

Desde que Thung et al. ⁽⁷³⁾, com amplificação pelo PAP, acharam positividade em 30% dos casos de CHC na superfície celular, vários autores ^(61,74,75,76), demonstraram a especificidade deste padrão de reatividade canalicular nos CHC. Em nossa casuística, 38 dentre 41 CHC (90,7%) resultaram positivos mediante amplificação pelo complexo ABC. Chamou-nos a atenção o fato de 36 de nossos casos de CHC (87,80%) apresentarem o

chamado "padrão biliar" de expressão antigênica, ou seja, localizando-se na face lateral sinusoidal, delineando "canalículos biliares", como se vê no fígado normal. Dentre os 70 adenocarcinomas de outras origens, tal padrão só foi visto em 2 casos, ambos de origem bileopancreática⁽⁷¹⁾. Este nosso achado confirma os de Thung et al.⁽⁷³⁾, Gangel et al.⁽⁷⁴⁾, Hurlimann e Gardiol⁽⁶¹⁾, e ainda demonstra que esta expressão peculiar é também vista, quando se usa amplificação pelo sistema ABC, nos CHC mais anaplásicos, exatamente quando a condição morfológica mais requer diagnóstico diferencial.

A Alfa-1-fetoproteína é produzida, na vida embrionária, principalmente por hepatócitos e por células da mucosa gastro-intestinal e do saco vitelíneo. O pico de sua concentração sérica é entre 12 e 14 semanas de gestação, caindo, então, rapidamente, atingindo, na maioria das vezes, o nível adulto normal já poucos meses após o nascimento⁽⁷⁰⁾. A detecção imuno-histoquímica de alfa 1- fetoproteína é relatada como um marcador específico de neoplasia hepatocelular, mas nos CHC sua sensibilidade é baixa⁽⁷³⁾. Entre nós, Carrilho et al. 1993⁽⁷⁷⁾ demonstraram positividade imuno-histoquímica para alfa1-fetoproteína no tecido neoplásico de 21 dentre 40 CHC (52,5 %) e no tecido não-tumoral em apenas 1 dentre 35 desses casos. Esta proteína não foi detectada em nenhum dos 41 casos de cirrose desacompanhada de neoplasia.

Diversos produtos de oncogenes já foram identificados em CHC, como a proteína p21 Ras, ausente em fígado normal, mas presente em nódulos cirróticos e em CHC⁽⁷⁸⁾. A positividade imuno-histoquímica para p53 reflete acúmulos anômalos desta proteína, que em sua forma natural tem vida média de 20 minutos, não sendo habitualmente detectável em tecido normal. Seja através de mutação "mis-sense", ou mesmo por acúmulo anormal de origem pós-translacional, a disfunção acarretada no controle do ciclo celular pode ser importante na carcinogênese⁽⁷⁹⁾. Tal positividade chega a 40 -50% em regiões como a África, em que adutos DNA-aflatoxina parecem participar dos mecanismos de carcinogênese, sendo consideravelmente inferior nas casuísticas européias ou norte-americanas. Em São Paulo, detectamos reatividade nuclear para p53 em 19 / 54 casos de CHC (35,2%)⁽⁸⁰⁾.

Antígenos Virais

Estudos epidemiológicos associam infecções pelos vírus das hepatites B e C ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Dentre os antígenos do VHB, o AgHBs é o mais universalmente detectado, servindo inclusive para o diagnóstico etiológico das diversas formas de infecção crônica pelo VHB⁽⁸¹⁾.

Cotrim et al.⁽⁸²⁾ detectaram AgHBs em 5 dentre 12 casos de CHC soro-positivos para o VHB (41,7%). A detecção imuno-histoquímica do AgHBc, considerado marcador de replicação viral, foi obtida em hepatócitos neoplásicos de apenas um destes 12 casos (8,3%), traduzindo a integração do DNA do VHB no genoma do hepatócito transformado, que geralmente deixa de expressar o gene core.

O vírus da hepatite C também é epidemiologicamente relacionado ao desenvolvimento de CHC. Ainda que marcadores imuno-histoquímicos não estejam disponíveis para aplicação prática para o VHC, Sansonno et al.⁽⁸³⁾ detectaram imuno-expressão tecidual de proteínas do core, envelope e NS-3, NS-4 e NS-5 no citoplasma de células neoplásicas, bem como em hepatócitos não-tumorais adjacentes, mostrando-se preditivas da presença de seqüências de RNA viral detectadas por hibridização molecular

" in situ ". Tal reatividade foi atribuída à persistência de replicação viral, mesmo nas fases de transformação neoplásica.

Marcadores de outros vírus hepatotrópicos são usualmente negativos no CHC.

Outros marcadores

Além dos marcadores já citados, há ainda numerosos outros, destacando-se o uso dos anticorpos monoclonais Hep-par e D11, relatados como úteis na identificação de histogênese hepatocelular ^(84,85).

A alfa-1-antitripsina pode ser detectada em casos de CHC, devidos ou não à deficiência desta anti-enzima. É importante considerar, entretanto, que este marcador pode estar presente em muitos outros tipos de células epiteliais, mesenquimatosas e particularmente histiocitárias. Uma grande quantidade de outros marcadores pode ser utilizada na identificação do CHC, tais como albumina, proteína C reativa, fator XIII-A, ferritina, receptores de transferrina, fibronectina, fibrinogênio, receptores de estrógenos e androgênicos, sem que se possa, entretanto, definir um perfil imuno-histoquímico patognomônico do CHC. Tais fatos sugerem, a despeito de certa homogeneidade morfológica, uma heterogeneidade funcional dos hepatócitos neoplásicos. A variação dos padrões imuno-histoquímicos será provavelmente devida a problemas técnicos e variações geográficas e etiológicas.

Hepatoblastoma

A neoplasia maligna epitelial mais freqüente na infância exibe abundante imunoe expressão de alfa-1-fetoproteína. A reatividade para p53 foi detectada em 9/21 casos recentemente estudados por Zerbini e cols tendo resultado negativa a pesquisa da oncoproteína c-erb-B2 ⁽⁸⁶⁾.

Colangiocarcinoma (CC)

Colangiocarcinoma intra-hepático ou carcinoma de ductos biliares periféricos é definido como a neoplasia maligna originada de (ou com diferenciação morfológica para) epitélio de ductos biliares. Seu padrão morfológico e molecular é idêntico ao dos originados em ductos biliares extra-hepáticos

As duas principais apresentações do colangiocarcinoma são a central (ou hilar), mais freqüente, e a periférica (ou lobular). O limite anatômico entre ambas é o ponto em que os ductos biliares de segunda ordem fundem-se para originar os ductos principais, direito ou esquerdo.

O colangiocarcinoma periférico (ou lobular) apresenta-se, em geral, como massa hipovascular, com hipocogenicidade ao ultrassom, com aspecto similar ao carcinoma hepatocelular. Macroscopicamente, mostra-se como lesão firme, esbranquiçada, de limites imprecisos.

A estrutura glandular é geralmente bem evidente nos colangiocarcinomas, predominando o padrão tubular. Também são vistas estruturas trabeculares ou papilares e, mais raramente, massas compactas. As células são de volume variado, predominando as cúbicas ou colunares. Seu citoplasma é pálido ou eosinófilo, sendo detectável algum tipo de mucina na maioria dos casos. Quando tal secreção é mais exuberante,

especialmente em casos com arquitetura tubular, o diagnóstico diferencial com metástases de adenocarcinomas de tubo digestivo fica ainda mais difícil. A resposta desmoplásica do estroma é uma característica marcante destas neoplasias, podendo atingir tal grau que as células neoplásicas distorcidas apresentem aspecto de difícil diferenciação com neoplasias vasculares, com o angiossarcoma e, especialmente, o hemangioendotelioma epitelióide.

O padrão imuno-histoquímico dos colangiocarcinomas inclui, além da positividade para CK 8 e 18, também próprias de hepatócitos e de outros epitélios, imunorreatividade para CK 7 e 19, que, assim como o antígeno da membrana epitelial (EMA) e o CEA, podem ser de utilidade no diagnóstico. Em nossa série de 32 carcinomas de ductos biliares intra e extra-hepáticos, 91% foram positivos para CK 8, sendo 91 % reativos para CK 7 e 97% para CK 19. O anticorpo policlonal anti-CEA reagiu com 95% dos casos, delineando estruturas similares a canalículos biliares em apenas 2 casos (5 %). Diferente do que observamos com CHC, o anticorpo monoclonal A5B7 anti-CEA mostrou reação em 23 dentre 31 carcinomas de ductos bileo-pancreáticos ^(36, 39).

Uma outra possível aplicação da imuno-histoquímica no estudo destas neoplasias é a expressão de CEA ⁽⁸⁷⁾ e da oncoproteína p53 ⁽⁸⁸⁾ como critério adicional para o diagnóstico de transformação neoplásica em ductos biliares de pacientes com colangite esclerosante primária, aspecto ainda a ser confirmado em estudos sequenciais de maiores casuísticas.

O hepato – colangiocarcinoma, definido como “tumor raro contendo elementos inequívocos tanto de carcinoma hepatocelular como de colangiocarcinoma intimamente misturados”, devendo apresentar aspectos histológicos identificando cada componente, como a produção de bile (hepatocelular) e de muco (colangiocarcinoma). Quando a lesão é morfológicamente pouco diferenciada, o estudo imuno-histoquímico é útil, caracterizando em cada componente o perfil imuno-histoquímico correspondente ⁽⁹⁰⁾.

Outras neoplasias

Dentre os diversos outros tipos de neoplasia que podem acometer o fígado, destacam-se as neuro-endócrinas e os sarcomas.

As neoplasias neuro-endócrinas podem ser identificadas através de marcadores "genéricos", sendo atualmente a cromogranina A a mais importante. As cromograninas são proteínas ácidas associadas com grânulos de secreção de células neuroendócrinas, diretamente relacionadas com a argirofilia. A maior delas, a cromogranina A, tem peso molecular 68 KD e apresenta ampla distribuição no SNED, sendo também detectados outros tipos, como a cromogranina B (secretogranina I) e a cromogranina C (secretogranina II) ⁽⁹¹⁾.

Até o início desta década, discutia-se o índice relativamente alto de tumores neuro-endócrinos com reação negativa para cromogranina A, mas a sensibilidade desta imunomarcagem elevou-se substancialmente após o advento dos sistemas de recuperação de epitopos pelo calor.

Outros marcadores neuro-endócrinos genéricos são a enolase gama (enolase neurônio-específica) e a sinaptofisina ⁽⁹¹⁾.

As neoplasias neuroendócrinas "neurais" são positivas para neurofilamentos e, geralmente, não co-expressam citoqueratinas. Seus principais representantes são o

Paraganglioma, o Feocromocitoma, o Tumor Neuroectodérmico Primitivo (PNET) e o Neuroblastoma.

Os tumores neuroendócrinos "epiteliais", positivos para os marcadores genéricos do SNED e para citoqueratinas, tanto as marcadas pela solução AE1+AE3 como, principalmente, pelas de baixo peso molecular, como as CK8/18. Neste grupo estão os tumores carcinóides, carcinomas neuroendócrinos de várias localizações, incluindo o carcinoma medular de tireóide, bem como os carcinomas de células pequenas de pulmão ("oat cell") e de pele (células de Merkel) ⁽⁹²⁾. O estudo das neoplasias neuro-endócrinas e seus marcadores é apresentado no Capítulo 7 deste Manual.

Dentre as neoplasias conjuntivas, destacam-se as de histogênese endotelial, em especial o Hemangioendelioma epitelióide e o Angiossarcoma. Ambas expressam os marcadores endoteliais CD 31, CD 34, antígeno relacionado ao Fator VIII e antígenos de grupos sanguíneos, especialmente o Ag H ⁽⁹³⁾. Ocasionalmente, no entanto, tem sido relatada positividade para citoqueratina, o que pode dificultar o diagnóstico diferencial ⁽⁹⁴⁾.

Neoplasias metastáticas no fígado

As neoplasias metastáticas no fígado exibem, em geral, o padrão da neoplasia original. A linhagem histogenética geralmente pode ser corretamente diagnosticada pelo perfil imuno-histoquímico da neoplasia.

O estudo do imunofenótipo mais característico de cada linhagem neoplásica foge ao escopo do presente capítulo.

Apenas como exemplo, em casos de neoplasia morfológicamente indiferenciada infiltrando o fígado, há que se pesquisar marcadores característicos de melanomas (vimentina, proteína S100 e HMB-45), linfomas (CD45, antígeno leucocitário comum, CD20 de linfócitos B, CD3 de linfócitos T, CD 30, de linfomas anaplásicos e D.Hodgkin), entre outros.

Dentre os carcinomas metastáticos, predominam os adenocarcinomas. O estudo de seus perfis imuno-histoquímicos, ainda que raramente patognomônicos, pode sugerir um ou mais órgãos de maior probabilidade de ser a sede da neoplasia original, reduzindo consideravelmente as hipóteses e, conseqüentemente, os métodos diagnósticos a utilizar ⁽⁹²⁾. Tal discussão é aprofundada no Capítulo 3 deste Manual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *J. Amer. Med. Ass.* 1965; 191: 101-106.
2. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495.
3. Balsano C, Billet O, Bennoum M, Cavard C, Zider A, Grimber G, Natoli G, Briand P, Levrero M. Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator in vivo. *J. Hepatol.* 1994; 21: 103-109.
4. Gowans EJ, Burrell CJ, Jilbert AR, Marmion BP. Detection of hepatitis B virus DNA sequences in infected hepatocytes by in situ cytohybridization. *J. Med. Virol.* 1981; 8:67-78.
5. Negro F, Pacchioni D, Mondardini A, Bussolati G, Bonino F. In situ hybridization in viral hepatitis. *Liver* 1992; 12: 217-226.
6. Hadziyannis S, Gerber M, Vissoulis C, Popper H. Cytoplasmic hepatitis B antigen in "ground glass" hepatocytes of carriers. *Archives of Pathology* 1973; 96: 327-330.
7. Millmanl, Zavatore V, Gerstley B.J.S, Blumberg B. Australia antigen detected in the nuclei of liver cells of patients with viral hepatitis by the fluorescent antibody technique. *Nature* 1969; 222: 181-4.
8. Alves V.A.F, Morais C.F, Santos R.T.M, Takeda A.K, Gayotto L.C.C. Utilização da técnica de anticorpos não marcados peroxidase (PAP) na detecção do antígeno de superfície da hepatite B em tecido hepático. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1980; 40: 101-106.
9. Rugge M, Guido M, Bortolotti F, Cassaro M, Cadrobbi P, Noventa F, Realdi G. - Histology and virus expression in the liver: a prognostic puzzle in chronic hepatitis B. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.* 1991; 419: 93-97.
10. Gudat F, Bianchi L, Sonnabend W, Thiel G, Aenishaenslin W, Stalder G.A. Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab. Invest.* 1975; 32: 1-9.
11. Silva EF, Chamone DAF, Strauss E, Alves VAF, Porta G, Lomar A, Saez-Alquezar A, Gayotto L.C.C, Silva L.C.: Etiology, hemostasis and production of prostacyclin synthesis stimulating plasma factor in severe acute hepatitis. *Gastroenterology* 1986; 90(5): 1768 a.
12. Chu CM, LIAW YF. Immunohistological study of intrahepatic expression of hepatitis B core and E antigens in chronic type B hepatitis. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 791-795.
13. Yoo JY, Howard R, Waggoner JG et al. Peroxidase-antiperoxidase detection of hepatitis B surface and core antigen in liver biopsy specimens from patients with chronic type B hepatitis. *J. Med. Virol.* 1987; 23:273-281.
14. Gayotto LCC, Alves VAF, Vianna MR et al. Histopathological, immunohistochemical and serological markers in chronic liver disease due to HBV. *J. Hepatol.* 1988; 7 (suppl.1): S 131.
15. Santos RTM, Alves VAF, Wakamatsu A, Nonogaki S, Carrilho FH, Silva LC, Gayotto LCC. Chronic hepatitis B immunohistochemistry – comparison of the amplification systems PAP and ABC for the detection of HbsAg and HbcAg. *Archivos Argentinos de Enfermedades del Aaparato Digestivo* 1996; 10: 10.
16. Wu PC, Lau JYN, Lau TK, Lau SK, Lai CL. Relationship between intrahepatic expression of hepatitis B viral antigens and histology in chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am.J.Clin.Pathol.* 1993; 100: 648-653.
17. Shafritz D.A, Shouval D, Sherman H.I, Hadziyannis S.J, Kew M.C. - Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of the cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1981; 305:1067-1073.
18. Van Den Oord JJ, Facchetti F, Wolf-Peeters C, Desmet VJ. Binding of biotin to hepatitis B surface antigen: A possible pitfall in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1989; 37: 551-554.
19. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to Hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 1980; 73: 626-632.

20. Trepo CG, Robert D, Motin J. Hepatitis B antigen and/or antibodies (anti-HBs and anti-HBc) in fulminant hepatitis: pathogenic and prognostic significance. *Gut* 1976; 17:10-13.
21. Mondelli M, Tedder RS, Ferns B, Pontisso P, Realdi G, Alberti A. Differential distribution of hepatitis B core and e antigens in hepatocytes: analysis by monoclonal antibodies. *Hepatology* 1986; 6:199-204.
22. Villari D, Pollicino T, Spinella S, Russo F, Camplo S, Rodina G, Squadrito G, Longo G, Raimondo G. Hepatitis B e antigen detection in formalin-fixed liver biopsy specimens- A tool to investigate wild-ktype and E-minus variant HBV infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995; 103: 136-140.
23. Naoumov NV, Daniels HM, Davison F, Eddleston ALWF, Alexander GJM, Williams R. Identification of hepatitis B virus-DNA in the liver by in situ hybridisation using a biotinylated probe. Relation to HBcAg expression and histology. *J. Hepatol.* 1993; 19: 204-210.
24. Burrell CJ, Gowans EJ, ROWLAND R, HALL P, Jilbert AP, Marmion BP. Correlation between liver histology and markers of hepatitis B virus replication in infected patients: A study by in situ hibridization. *Hepatology* 1984; 4:20-24.
25. Santos RTM, Alves VAF, Wakamatsu A, Nonogaki S, Carrilho FH, Silva LC, Gayotto LCC. Chronic hepatitis B - detection of viral genoma sequences through non-isotopic in situ hybridization. *Archivos Argentinosde Enfermedades del aparato digestivo* 1996; 10 : 54.
26. Lau JYN, Naoumov NV, Alexander GJM, WILLIAMS R. Rapid detection of hepatitis B virus DNA in liver tissue by in situ hybridisation and its combination with immunohistochemistry for simultaneous detection of HBV antigens. *J. Clin. Pathol.* 1991; 44: 905-908.
27. Rizzetto M, Verme G, Recchia S. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of the delta antigen: An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *An. Intern. Med.* 1983; 98: 437-441.
28. Rizzetto M. The delta agent. *Hepatology* 1983; 3: 729-737.
29. Fonseca JCF, Gayotto LCC, Ferreira LCL, Araújo JR, Alecrim WD, Santos RTM, SIMONETTI JP, Alves VAF. Labrea hepatitis: Hepatitis B and delta antigen expression in liver tissue: report of three autopsy cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1985; 27:224-227.
30. Moreno A, Ramon Y, Cajal S, Marazuela M, Carrejo V, Milicua JM, Cerezo E, Cuesta C, Oliva H. Sanded nuclei in delta patients. *Liver* 1989; 9:367-371.
31. Pacchioni D, Negro F, Chiaberge E, Rizzetto M, Bonino F, Bussolati G. Detection of hepatitis delta virus RNA by a nonradioactive in situ hybridization procedure. *Hum. Pathol.* 1992; 23:557-561.
32. Bamber M, Murray AK, Weller IVD, Morelli A, Scheuer PJ, Thomas HC, Sherlock S. Clinical and histological features of a group of patients with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J. Clin. Pathol.* 1981; 34 : 1175-1180.
33. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, Johnson RG, Barbosa LH, NEMO GJ. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first and second-generation assays. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325:1325-1329.
34. Krawczynski K, Beach M.J, Bradley D.W, Kuo G, DI BISCEGLIE, A.M, Houghton M, Reys G.R, KIM, J.P, Choo Q.-L, Alter M.J. - Hepatitis C virus antigen in hepatocytes : Immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992; 103: 622-629.
35. Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y, Kasahara A, Fusamoto H, Mori C, Fuka J, Okayama H, Kamada T. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus - infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology*, 1992; 16(2): 306-311.
36. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medinaselby A, Barr P J, Weiner A.J, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1191; 88: 2451-2455.
37. Okamoto H, Kurai K, Okada S.I, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, MISHIRO, S. Full length sequence of hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992; 188: 331-341.
38. Wakamatsu A. Hepatite C. Análise crítica da detecção de marcadores imuno-histoquímicos em comparação com parâmetros histológicos de gravidade de lesão. São Paulo, 1966. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

39. Alves VAF, Wakamatsu A, Nonogaki S, Santos RTM, Stuyvert L, Maertens G, Van Der Borgh B, Gayotto LCC. Hepatitis C – Immunohistochemical detection of HCV core antigen and possible pathogenetic implications. *Modern Pathology* 1998; 11: 150 A.
40. Saad RS, Demetris AJ, Lee RG, Kusne S, Randhawa PS. Adenovirus hepatitis in the adult allograft liver. *Transplantation* 1997; 64: 1483-5.
41. Dombrowsky F, Eis-Hubinger AM, Ackermann T, Blumel J, Spengler V, Pfeifer U. Adenovirus-induced liver necrosis in a case of AIDS. *Virchows Arch.* 1997; 431: 469-472.
42. Yan Z, Nguyen S, Poles M, Melamed J, Scholes JV. Adenovirus colitis in human immunodeficiency virus infection: a underdiagnosed entity. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22: 1101-6.
43. Brés PLJ. A century of progress in combating yellow fever. *Bulletin W.H.O.* 1986; 64:775-786.
44. Schatzmayr HG, Barth OM, Alencar AA. Demonstração por imunofluorescência direta de antígenos do vírus da febre amarela em tecido hepático pré-tratado com tripsina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1984; 79:93-99.
45. De la Monte SM, Linhares AL, Travassos da Rosa APA. Immunoperoxidase detection of yellow fever virus after natural and experimental infection. *Trop. Geogr. Med.* 1983; 35: 2135-241.
46. De Brito T, Siqueira SAC, Santos RTM; Nassar ES; Coimbra TL, Alves VAF. Human fatal yellow fever: Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidneys and heart. *Pathol. Res. Pract.* 1991; (in press)
47. Paya CV, Hermans PE, Washington JA et al. Incidence, distribution and outcome of episodes of infection in 100 orthopic liver transplantations. *Mayo Clin. Proc.* 1989; 64:555-564
48. Paya CV, Holley KE, Wiesner RH et al. Early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients: role of immunostaining, DNA hybridization and culture of hepatic tissue. *Hepatology* 1990; 12:119-126.
49. Wanless I R : Physioanatomic considerations – Chap. 1: pg. 3 – 37 in Schiff's Diseases of the liver, Eighth Edition, edited by Eugene R.Schiff, Michael F.Sorrell and Willis C. Maddrey, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.
50. Jorgensen M. A. Stereological study of intrahepatic bile ducts. 2. Bile duct proliferation in some pathological conditions. *Acta Pathol Microbiol Scand (A)* 1973; 81: 663-669.
51. Gall JAM, Bathal PS. Morphological and immunohistochemical assessment of intrahepatic bile duct development in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 1989; 4: 241-250.
52. Koga A. Morphogenesis of intrahepatic bile ducts of the human fetus. Light and electron microscopic study. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1971; 135: 156-184.
53. Shiojiri N. The origin of intrahepatic bile ducts cells in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1984; 79: 25-39.
54. Desmet, VJ. Intrahepatic bile ducts under the lens. *J. Hepatol.* 1985; 1: 545–559.
55. Van Eyken, P.; Sciôt R.; Callea F; van der Steen K; Moerman P; Desmet, VJ.: The development of the intrahepatic bile ducts in man : A keratin- immunohistochemical study. *Hepatology* 1988; 8: 1586 – 1595.
56. Ruebner BH, Blankenberg TA, Burrows DA, Scohoo W, Lund JK. Development and transformation of the human hepatocytic-ductal plate. *Lab Invest* 1989; 60: 7P.
57. Shah KD, Gerber MA. Development of intrahepatic bile ducts in humans. Immunohistochemical study using monoclonal cytokeratin antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 1135-1138.
58. Stosiek P, Kasper M, Karsten U. Expression of cytokeratin 19 during human liver organogenesis. *Liver*, 1990; 10: 59-63.
59. Kahn E, Markowitz J, Aiges H, Daum F. Human ontogeny of the bile duct to portal space ratio. *Hepatology* 1989; 10:21-23.
60. Johnson, DE; Herndier,BG ; Medeiros , LJ; Warnke, R. Rouse, R.V. : The diagnostic utility of keratin profiles of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988; 12: 187–197.
61. Hurlimann, J ; Gardiol, D. Immunohistochemistry in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991; 15 : 280–288.

62. Van Eyken, P.; Sciote, R.; Paterson, A.; Callea, F.; Kew, M.C.; Desmet, V.J. Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.*, 1988b; v.19, p.562-8.
63. Peroco, M.A.; Alves, V.A.F.; Wakamatsu, A.; Di Loreto, C.; Carrilho, F.J.; Silva, L.C.S.; Gayotto, L.C.C.: Adenocarcinomas no fígado: distribuição das citoqueratinas em tumores primários e metastáticos. *Anais do Congresso Brasileiro de Hepatologia*, Salvador, 1993, pg.46.
64. Van Eyken, P.; Sciote, R.; Desmet, V.J. A cytokeratin immunohistochemical study of alcoholic liver disease; evidence that hepatocytes can express "bile duct type" cytokeratins. *Histopathology*, 1988a; v.13, p.605-17.
65. Liu, M.H.; Han, T.; Lenzi, R.; Slott, P.A.; Tavoloni, M. Immunohistochemical characteristics of bile duct like (oval) cells proliferations during chemical hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 1989; v.10, p.621.
66. Hsia, C.C.; Everts, R.P.; Nakatsukasa, H.; Marsden, E.R.; Thorgeirsson. Occurrence of oval cell-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 1992, v.16, p.1327-33.
67. Van Eyken P. & Desmet, V.J. Cytokeratins and the liver. (Invited Review), *Liver*, 1993; v.13, p.113-22.
68. Peroco MA. Adenocarcinomas no fígado. Contribuição da imuno-histoquímica ao diagnóstico diferencial do sítio de origem. Tese, Doutorado, Faculdade de Medicina, 1995.
69. Hardwood PJ; Britton DW; Boxer GM; Rawlings G; Rogers GT. Mapping epitope characteristics of carcinoembryonic antigen. *Br. J. Cancer* 1986; v.54, p.75-82.
70. Brumm C; Schulze C; Charles K; Morohoshi T; Klöppel G. The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology* 1989; v.14, p.503-13.
71. Alves VAF; Peroco M.A.; Wakamatsu A; Carrilho FJ; Silva LCC; Gayotto LCC. Padrões imuno-histoquímicos do antígeno carcino-embriônico e da glicoproteína biliar na avaliação da origem de adenocarcinomas no fígado. *Anais do Congresso Brasileiro de Hepatologia*, Salvador, 1993, pg.57.
72. Primus FJ; Wang RH; Sharkey RM; Goldenberg DM. Detection of carcinoembryonic antigen in tissue sections by immunoperoxidase. *J. Immunol. Methods* 1975; v.8, p.267-75.
73. Thung SN; Gerber MA; Sarno E; Popper H. Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest.* 1979, 41: 101-105.
74. Gangei P; Nadji M; Albores-Saavedra J; Morales AR. Histologic markers in primary and metastatic tumors of the liver. *Cancer* 1988; v.62, p.1994-8.
75. Christensen WN; Boitnott JK; Kuhajda FP. Immunoperoxidase staining as a diagnostic aid for hepatocellular carcinoma. *Mod. Pathol* 1989; v.2, n.1, p.8-12.
76. Sheahan K; O'Brien MJ; Burke B; Dervan PA; O'Keane JC; Gottlieb LS; Zamcheck N. Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA - related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990; v.94, p.157-64.
77. Carrilho FC; Alves VAF; Wakamatus A; Ginabreda GP; França AVC; Fonseca LEP; Laudanna AA; Gayotto LCC; Silval L C. Estudo da alfa1-feto-proteína no soro e tecido hepático de pacientes cirróticos com e sem carcinoma hepatocelular. *Anais do Congresso Brasileiro de Hepatologia*, Salvador, 1993, pg.57.
78. Nonomura A; Ohta G; Hayashi M. Immunohistochemical detection of ras oncogene p21 product in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am.J.Gastroenterol.* 1987; 82: 512-8.
79. Winford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J. Pathol.* 1992; 166: 329-330.
80. Alves VAF, Carrilho FJ, Gayotto LCC, Wakamatsu A, Grosso S, Laudana AA, Silva LC. Immunohistochemistry of p53 in hepatocellular carcinoma in São Paulo, Brazil. *Hepatology* 1994; 19: 39i.
81. Gayotto LCC; Alves VAF; Vianna MR; Strauss E; Carrilho FJ; Silva LC. Histopathological, immunohistochemical and serological (e System) markers in chronic liver disease due to HBV. *J. of Hepatol.* 1988; 7 (Suppl.) S 131.
82. Cotrim H; Alves VAF; Andrade Z; Lyra L. Hepatocellular carcinoma in Salvador, Bahia. A histologic and immunohistochemical study aiming hepatitis B markers. *Acta Hepatol.* 1991; 1: 39- 42.

83. Sansonno D; Cornachiulo V; Racanelli V; Dammacco F. In situ simultaneous detection of hepatitis C virus RNA and hepatitis C virus – related antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 22–33.
84. Leong AS; Sormunen RT; Tsui WM; Liew CT. Hep Paar 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumours and metastatic carcinoma. *Histopathol.* 1998; 33 : 318–324.
85. Tartour E; Caillou B; Tenenbaum F; Schroder S; Luciani S; Talbot M; Schlumberger M. Immunohistochemical study of adrenocortical carcinoma. Predictive value of the D 11 monoclonal antibody. *Cancer* 1993; 72: 3296–3303.
86. Zerbini MCN; Sredni ST; Grier H; Cristofani LM; Latorre MRDO; Hollister KA; Alves VAF; Weinberg DS; Perez-Atayde A. Primary malignant epithelial tumors of the liver in children: A study of DNA content and oncogene expression. *Pediatric and Developmental Pathology* 1998; 1: 270–280.
87. Nakajima T; Kondo Y. Well differentiated cholangiocarcinoma: diagnostic significance of morphologic and immunohistochemical parameters. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989; 13: 569-573.
88. Rizzi PM; Ryder SD; Portmann B; Ramage JK; Naumov NV; Williams R. p53 protein overexpression in cholangiocarcinoma arising in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996; 38: 265-268.
89. Ishak KG; Anthony PP; Sobin LH. Histological typing of tumours of the liver. *International Histological Classification of Tumours WHO, 2nd ed., Hong Kong, Springer-Verlag, 1994.*
90. Maeda T; Adachi E; Kajiyama K; Sugimachi K; Tsuneyoshi M. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: Proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features. *Hum Pathol* 1995; 26: 956-964.
91. Lloyd RV; Mervak T; Schmitt K; Warner TFCS; Wilson BS. Immunohistochemical detection of chromogranin and neuron-specific enolase in pancreatic endocrine neoplasms. *Am.J.Surg.Pathol.* 1984; 8:607-614.
92. Bacchi CE; Demachki S; Bacchi MM. Caracterização do sítio primário de carcinomas metastáticos : Abordagem imuno-histoquímica. *J. Bras. Patol.* 1996; 32 : 168–178.
93. Miettinen M; Lindenmayer AE; Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34 and BNH9 antibody to H – and Y – antigens – evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod. Pathol.* 1994; 7 : 82 –90.
94. Gray MH, et al. Cytokeratin expression in epithelioid vascular neoplasms. *Hum Pathol* 1990; 21:212.
95. Taylor, C. R.; Cote, R. J. : *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathology.*, second ed. W.B.Saunders, Philadelphia, 1994.
96. Colvin RB; Bhan AK; McCluskey RT: *Diagnostic immunopathology*, second ed., Raven Press, New York, 1995.

21. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS EM IMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU"

Raimunda Telma M. Santos, Alda Wakamatsu, Cristina T. Kanamura, Suely Nonogaki e Glauce Aparecida Pinto

ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO. CUIDADO COM REAGENTES. BIO-SEGURANÇA

As atividades do laboratório de imuno-histoquímica são desenvolvidas em vários setores, que devem dispor de uma área física adequada de modo a possibilitar que as tarefas sejam desempenhadas satisfatoriamente. Deve-se considerar condições ambientais: além de fatores como higienização, iluminação, ventilação e exaustão, é desejável a instalação de balcões, pias, pisos e revestimentos laváveis e de fácil conservação. Outras recomendações incluem a capacitação da equipe de recursos humanos envolvida nas tarefas laboratoriais, que devem ter conhecimento de como proceder durante o manuseio de reagentes químicos e biológicos e estar alerta para os sintomas que indiquem intoxicações e/ou envenenamentos ⁽¹⁾.

A organização do laboratório

1. Setores laboratoriais

- **recepção de material** - o material deverá estar acompanhado de requisição médica, com todos os dados clínicos do paciente (nome, idade, sexo, localização da lesão biopsiada, suspeita clínica), nome do médico requisitante, instituição a que pertence e telefone para contato. As informações serão registradas, em livro de registro interno e/ou via computador (se o serviço for informatizado), receberão um número de identificação interno e o material encaminhado ao processamento técnico.

- **processamento técnico** - neste setor será verificada a necessidade de obtenção de cortes histológicos (2 a 3 μ m de espessura) pela microtomia, em 10 lâminas, no mínimo. Uma das lâminas será submetida à coloração de Hematoxilina-eosina, que será analisada pelo médico-patologista que, então, requisitará um painel de antígenos a serem pesquisados na amostra. O restante das lâminas será submetida aos procedimentos imuno-histoquímicos.

- **microscopia** - neste setor procede-se a leitura das lâminas coradas e diagnóstico, mediante perfis histopatológico e imuno-histoquímico. Os resultados serão encaminhados para registro em livro e/ou computador.

- **arquivos - lâminas** (todas as lâminas coradas serão arquivadas indefinidamente)

lâminas em branco (controle positivo para os diferentes antígenos)

requisições/laudos (2ª via resultado)

blocos de parafina (além dos casos encaminhados para diagnóstico, é interessante manter, também, um arquivo de casos-controle de diferentes tecidos, normais e neoplásicos, pois terão grande utilidade no controle de qualidade das reações imuno-histoquímicas e na padronização de anticorpos, como serão vistos adiante).

- **secretaria** - neste setor serão executados a datilografia dos resultados e a expedição dos laudos, de acordo com a procedência (pessoalmente ou via correio).

2. Equipamentos e material permanente

- balcão(ões) com pia para bateria de coloração e demais procedimentos técnicos
- armário para armazenamento de reagentes químicos
- armário-arquivo para lâminas
- armário-arquivo para blocos de parafina
- armário-arquivo para requisições/laudos
- capela para exaustão de vapores/gases
- micrótomo rotativo e banho-maria histológico
- estufa bacteriológica (37 °- 56° C)
- estufa para secagem/esterilização (50 °- 200 ° C)
- microscópio óptico comum binocular
- balança analítica eletrônica
- pHmetro
- refrigerador comum
- freezer comum
- forno de microondas (potência de saída 900W)
- panela de pressão de aço inoxidável (capacidade 4 litros ou mais)
- pipetas automáticas (de volumes ajustáveis)

Cuidado com reagentes e bio-segurança

Para o desenvolvimento das atividades no Laboratório de Imuno-histoquímica, como em todos os laboratórios em geral, vale lembrar que as normas de bio-segurança devem ser observadas e são de extrema relevância. As amostras, antes e após fixação, e todo material exposto às mesmas, deve ser manuseado como capaz de transmitir infecção. Nunca pipetar reagentes pela boca e evitar contato, pela pele e mucosas, com reagentes e amostras. O uso obrigatório de avental, luvas descartáveis, óculos de segurança, máscaras, roupas protetoras e procedimentos simples como lavar as mãos antes e após a manipulação de reagentes biológicos são de fundamental importância. Deve-se respeitar, ainda, proibições como não fumar e não trazer ao laboratório qualquer material não relacionado às atividades nele realizados.

Os acidentes mais comuns em laboratório incluem queimaduras, contato com soluções de ácidos ou álcalis nos olhos, intoxicações por gases e ingestão de substâncias tóxicas⁽²⁾. Em casos de queimaduras pode-se proceder da seguinte forma:

- a) queimaduras causadas por calor seco (chama e objetos aquecidos): aplicar pomada de picrato de butesina; nas queimaduras graves, cobrir o local com gase esterilizada umedecida com solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5%.
- b) queimadura por ácidos: lavar imediatamente o local com água em abundância, por 5 minutos e, em seguida, com solução saturada de bicarbonato de sódio e novamente com água; secar e aplicar mertiolate.
- c) queimadura por álcalis: lavar imediatamente com bastante água, por 5 minutos e, em seguida, com solução de ácido acético a 1% e novamente com água; secar e aplicar mertiolate.

Nos casos de contato dos olhos com soluções de ácidos ou de álcalis, proceder a lavagem (em lavador de olhos apropriado para este fim, acoplado ao chuveiro de emergência), durante 15 minutos e aplicação de solução de bicarbonato de sódio a 1%, no caso de contato com ácido, ou ácido bórico a 1%, quando em contato com álcalis.

Na intoxicação por gases, proceder a remoção da vítima para ambiente bem arejado, deixando-a descansar. Quando ocorrer a ingestão acidental de substâncias tóxicas, administrar uma colher de sopa de "antídoto universal", constituído de duas partes de carvão ativo, uma de óxido de magnésio e uma de ácido tânico.

Alguns reagentes necessitam de cuidados especiais de manuseio e descarte, que serão discutidos oportunamente mais adiante.

Dentre os reagentes empregados no laboratório de imuno-histoquímica, os anticorpos são os que mais influenciam para um ótimo desempenho da metodologia e, quando observadas certas regras básicas em seu manuseio e estocagem, muitos permanecem estáveis por vários meses, ou até anos ⁽³⁾.

Apesar de muitos anticorpos e kits comercialmente produzidos terem sua estabilidade garantida por alguns anos, algumas precauções seguidas pelo usuário ajudarão a manter esta estabilidade. Todo anticorpo e kit deve ser acompanhado de um registro (para controle interno, por exemplo, ficha de cadastro), que contenha todas as informações acerca de sua fabricação (fabricante, clone - se anticorpo monoclonal, código do fabricante, lote, volume, data de validade), pois elas serão valiosas inclusive em caso de reclamações posteriores.

Os dois pontos mais importantes da estocagem de anticorpos e kits são o recipiente e a temperatura. Para estocagem de soluções proteicas é preferível o emprego de recipientes que tenham absorvidade desprezível de proteínas; aqueles produzidos a partir de polipropileno, policarbonato ou borossilicato (vidro) são os mais recomendados e mais largamente utilizados. Os refrigeradores e freezers empregados na estocagem de imuno-reagentes devem ser monitorados constantemente e estar ligados a um sistema que permita utilização de energia de emergência (via gerador) em caso de falta de energia elétrica.

Anticorpos pré-diluídos e conjugados devem ser armazenados de 4° a 8° C, pois o congelamento e descongelamento freqüentes têm efeito deletério sobre as proteínas. Soluções proteicas concentradas, como anti-soros e frações de imunoglobulinas devem ser armazenadas congeladas em alíquotas a -20° C ou abaixo, e manter em refrigerador a alíquota em uso.

Os cuidados apropriados com estes reagentes podem reduzir os problemas associados à contaminação, calor, exposição excessiva à luz. A contaminação pode ser evitada pelo uso de ponteiras (de pipetas automáticas) limpas; o pronto retorno dos reagentes às condições ideais de armazenagem prolongará sua vida útil. Todo imunoreagente contaminado com fungos ou bactérias deve ser descartado. Seu emprego nos procedimentos imuno-histoquímicos irá introduzir artefatos e coloração não-específica.

Todo anticorpo adquirido, assim que recebido pelo laboratório, deve ser, senão imediatamente, testado o mais breve possível para atestar sua qualidade. Este teste consiste em determinar o título do anticorpo, isto é, a maior diluição deste anticorpo que resulte em uma coloração ideal, específica e com o mínimo de "coloração de fundo" ("background"). Desta forma, a titulação deve ser realizada em material que sabidamente contenha o antígeno em questão (controle positivo), utilizando-se várias diluições do anticorpo (normalmente aquele sugerido pelo fabricante e seus múltiplos: 2X, 4X, 8X, etc.) e empregando-se ou não técnicas de recuperação antigênica (digestão proteolítica, microondas, panela de pressão). Uma vez determinado, o título deve ser incluído na ficha de cadastro do anticorpo, sem se esquecer de informar, também, a metodologia empregada em sua determinação (com/sem recuperação antigênica, tempo de incubação, tipo de amplificação, etc.). Em seguida, procede-se o fracionamento do anticorpo em alíquotas, que devem ser acondicionadas em recipientes adequados (polipropileno ou borosilicato) e armazenados em freezer. O número de alíquotas deve constar na ficha de cadastro, pois ele será importante no controle de fluxo de saída do anticorpo e alertar para o momento de uma nova aquisição.

PROTOSCOLOS DE IHQ. REAGENTES E SOLUÇÕES

A interpretação diagnóstica através dos métodos imuno-histoquímicos depende, na maioria das vezes, da boa qualidade dos espécimes utilizados e da preservação dos seus antígenos, que requer cuidados prévios ao longo de toda a rotina histopatológica, incluindo a obtenção, o manuseio e a fixação adequadas.

Mesmo com todos os cuidados, o uso de fixadores à base de formaldeído, devido à sua composição e o seu processo de ligação às moléculas, formando as "pontes aldeído-proteína", podem alterar, destruir ou "mascarar" alguns antígenos ou epítomos.

Como recurso para recuperação desses antígenos ou epítomos, podemos utilizar tratamento com enzimas proteolíticas, irradiação por microondas ou denaturação em calor úmido. Estes métodos serão discutidos mais detalhadamente no capítulo destinado à recuperação antigênica.

Estes tratamentos para recuperação antigênica são muito agressivos, e para evitar que os cortes descolem das lâminas é aconselhável que sejam previamente preparadas com adesivos como o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) ⁽⁴⁾.

Em relação aos métodos e sistemas de detecção em IHQ, estamos descrevendo os dois métodos mais utilizados, os complexos Peroxidase-anti-peroxidase (PAP) ⁽⁵⁾ e Avidina-biotina-peroxidase (ABC) ⁽⁶⁾, e sua modificação Estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC), que são altamente sensíveis e específicos.

1. Preparação das lâminas – silanização

1.1. Lavagem das lâminas

- mergulhar as lâminas em solução de detergente neutro Extran (Merck 7553) a 0,5% em água, por 30 minutos;
- desprezar o detergente e lavar em água corrente até a completa remoção do detergente (no mínimo por 2 horas);
- lavar as lâminas em água quente;
- secar em estufa
- guardar as lâminas limpas em caixas para evitar contaminação por poeira.

As lâminas limpas deverão ser manipuladas com luvas para evitar a contaminação das mesmas pela oleosidade da pele.

1.2. Silanização das lâminas

O APTS (silano) pode causar queimaduras na pele, portanto, o mesmo deverá ser manipulado com luvas e com cuidado. Ao medir um volume pequeno de APTS utilizar pipeta graduada e pera de borracha, e para volumes maiores, provetas graduadas. O frasco que acondiciona o APTS deverá ser conservado em geladeira.

Preparar 3 cubas de vidro com tampa, na capela:

1ª) acetona p.a.;

2ª) solução de APTS (Sigma A3648) a 4% em acetona ;

3ª) acetona p.a.

A silanização é processada da seguinte forma:

- imersão das lâminas em acetona (1ª cuba) por 2 minutos; esgotar muito bem o excesso de acetona para não diluir a solução de APTS;
- imersão em APTS a 4% (2ª cuba) por 2 minutos; esgotar bem o excesso;
- imersão em acetona (3ª cuba) por 4 vezes; esgotar bem o excesso;
- secagem em estufa; deixar esfriar e guardá-las em caixas.

☞ o conteúdo da primeira e da última cuba poderão ser desprezados diretamente na pia e diluídos pela água corrente. O conteúdo da segunda cuba (com APTS) **não deverá ser descartado na pia**, mas conservado em frascos devidamente identificados para posterior descarte, seguindo as recomendações da CETESB.

☞ o silano diluído em acetona **não** poderá ser reaproveitado. Desta forma, convém aproveitá-lo ao máximo todas as vezes em que for realizado o procedimento de silanização.

1.3. Obtenção dos cortes histológicos

Os blocos de parafina, com materiais processados histologicamente, são resfriados em congelador e cortados em micrótomo rotativo, onde serão obtidos cortes histológicos de 2 a 3 μm de espessura, utilizando-se navalhas (descartáveis ou não) próprias para este fim. As navalhas deverão ser manipuladas com muito cuidado, pois são extremamente cortantes. Durante o processo de microtomia, toda atenção deverá estar voltada para o aparelho, pois trata-se de uma atividade perigosa.

Ao interromper o trabalho e se ausentar da sala de microtomia, mesmo que por poucos minutos, recomenda-se que a navalha seja retirada do suporte no micrótomo e guardada em local seguro até a retomada desta atividade.

Desta forma evitam-se acidentes.

As fitas de parafina obtidas no processo de corte pela microtomia são cuidadosamente colocadas em banho-maria histológico e os cortes depositados em lâminas previamente tratadas com APTS. As lâminas com os cortes são levadas à estufa a 60° C e lá deixadas por 24 horas para melhor adesão do tecido.

☞ o banho-maria histológico **não** deverá conter gelatina ou outros tipos de cola, pois as mesmas poderão interferir na ação do APTS.

☞ **Não** jogar as navalhas diretamente no lixo, mas depositá-las em caixas apropriadas de descarte de materiais perfuro-cortantes.

2. Procedimentos imuno-histoquímicos

2.1. Preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação)

- xilol a 60° C por 15 minutos
- xilol à temperatura ambiente por 15 minutos
- etanol 100 % (3X) por 30 segundos cada
- etanol 95% por 30 segundos
- etanol 80% por 30 segundos
- etanol 70% por 30 segundos
- lavagem em água corrente e destilada

☞ o xilol é nocivo à saúde; evitar a inalação durante seu manuseio trabalhando em capela de exaustão.

2.2. Recuperação antigênica

As amostras fixadas em formalina, especialmente quando não foi possível o controle de pH ou do tempo de fixação (superior a 24 horas), requerem recuperação antigênica para a grande maioria dos epítomos habitualmente pesquisados ⁽⁷⁾. Os principais métodos são:

- **digestão enzimática** - podem ser utilizadas várias enzimas para digestão proteolítica e, em nosso laboratório, incubamos as lâminas com solução de tripsina 30 mg% (Sigma T-8128) e cloreto de cálcio 134 mg% em PBS, pH 7,8, durante 20 minutos a 37°C, seguindo-se lavagens em água corrente e destilada.
- **irradiação por microondas:** as lâminas são incubadas em tampão citrato 10 mM / pH6,0, em forno de microondas (potência máxima), por 9 minutos (duas vezes)⁽⁸⁾, esfriadas por 20 minutos, seguindo-se lavagens em água corrente e destilada.
- **incubação em calor úmido:** as lâminas são incubadas em tampão citrato 10 mM / pH6,0, em panela de pressão, durante 4 minutos contados a partir da fervura⁽⁹⁾; após esfriamento por 20 minutos, seguem-se lavagens em água corrente e destilada.

2.3. Bloqueio da peroxidase endógena

Procede-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol (ou solução comercial a 3% = 10 volumes), em dois banhos de 10 minutos cada; seguem-se lavagens em água corrente e destilada, e PBS.

2.4. Reação utilizando o Complexo Peroxidase-anti-peroxidase (PAP), de acordo com princípio proposto por Sternberger e colaboradores⁽⁵⁾, e adaptado às nossas condições laboratoriais:

- Incubar as lâminas com anticorpo específico (policlonal ou monoclonal), diluído em tampão PBS-diluyente, durante 16 a 18 horas a 4°C, em câmara úmida.
- Lavar em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.
- Incubar com anticorpo secundário (anti-Ig da espécie animal em que foi obtido o anticorpo específico), diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
- Lavar em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.
- Incubar com complexo PAP, obtido na mesma espécie animal do anticorpo específico, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
- Lavar em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.
- Revelação e montagem:
 - Incubar as lâminas em solução substrato (Diaminobenzidina - DAB - 60 mg%), durante 3 a 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, observar ao microscópio as lâminas controle-positivo, o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação.
- Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos
- Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavar em água corrente e destilada
- Imergir 4 vezes (rapidamente) em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%), lavando, em seguida, em água corrente e destilada.
- Desidratar as lâminas em: etanol 50%
- etanol 80%

- etanol 95%
- etanol 100% (3 vezes)
- xilol (3 vezes)
- Montagem em lâmina com Entellan (Merck 1.07961) para leitura em microscopia óptica comum.

2.5. Reação utilizando o Complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABC) / Estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC), de acordo com princípio proposto por Hsu e colaboradores ⁽⁶⁾, adaptado às nossas condições laboratoriais

- Incubar as lâminas com anticorpo específico (policlonal ou monoclonal), diluído em tampão PBS-diluyente, durante 16 a 18 horas a 4°C, em câmara úmida.
- Lavar em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada
- Incubar com anticorpo secundário biotilado (anti-Ig da espécie animal em que foi obtido o anticorpo específico), diluído em PBS, durante 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
- Lavar em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.
- Incubar com complexo ABC/StreptABC diluído em tampão PBS, durante 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
- Lavar em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.
- Proceder a revelação e montagem como descrito para o método PAP.

3. Reagentes e soluções

3.1. Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M / pH 7,4

(fórmula 20 X concentrada):

Cloreto de sódio p.a. (NaCl)	160,00 g
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a. (Na ₂ HPO ₄)	27,31 g
Fosfato de sódio monobásico di-hidratado p.a. (NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O)	4,86 g
Água destilada, q.s.p.	1000 ml

Para uso diluir 1/20 em água destilada e acertar o pH.

3.2. Solução tampão PBS-diluyente

Soroalbumina bovina (BSA) fração V (Sigma A9647)	1,0 g
Azida sódica p.a. (NaN ₃)	0,1 g
Tampão PBS q.s.p.	100,0 ml

☞ a azida sódica, aqui empregada como preservativo, deve ser manuseada com precaução, pois é muito tóxica se ingerida e forma um composto altamente explosivo quando em contato com alguns metais.

☞ não utilizar soluções contendo azida sódica para diluir reagentes conjugados com peroxidase, pois, esta é inativada na presença dessa substância.

3.3. Solução substrato-cromogênico

Diaminobenzidina (tetracloridrato) (Sigma D5637)	0,06 g
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 3%	2,00 ml
Dimetilsulfóxido p.a.	1,00 ml
Tampão PBS q.s.p.	100,00 ml

Dissolver o DAB no tampão PBS (previamente aquecido a 37°C), filtrar e acrescentar o peróxido de hidrogênio e o dimetilsulfóxido.

☞ a diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico. Ao manipulá-lo, usar luvas de borracha e, de preferência, pinças não-metálicas; estocá-lo dentro de dessecador, em freezer.

☞ o descarte da solução deve ser precedido de adição de água sanitária v/v (solução de Hipoclorito de sódio a 2,5%) para sua degradação.

3.4. Solução tampão citrato 10 mM / pH 6,0

Ácido cítrico monohidratado p.a.	2,1 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 2N.

3.5. Solução de tripsina 0,03% / pH 7,8

Tripsina porcina tipo II (Sigma T8128)	0,030 g
Cloreto de cálcio p.a.	0,134 g
Tampão PBS q.s.p.	100,0 ml

Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 1N.

3.6. Solução de formalina 10% tamponada

Formaldeído (em solução 35 - 40%) p.a.	100,0 ml
Fosfato de sódio monobásico monohidratado p.a.(NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	4,0 g
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a. (Na ₂ HPO ₄)	6,0 g
Água destilada q.s.p.	100,0 ml

o formaldeído é nocivo à saúde; preparar a solução em ambiente com boa exaustão (capela).

PROTOSCOLOS DE HIS. REAGENTES E SOLUÇÕES

Para detecção de ácidos nucleicos (DNA e RNA), utilizamos métodos de hibridização molecular "in situ" com sondas marcadas com biotina (Brigatti) ⁽¹⁰⁾ ou com digoxigenina, e sistemas de amplificação conjugados com fosfatase alcalina ou peroxidase.

1. Preparação dos cortes histológicos

- Obtenção dos cortes histológicos de 2 a 3 µm de espessura, a partir de material embocado em parafina, em lâminas previamente tratadas com APTS e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C para melhor adesão do tecido na lâmina.

2. Procedimentos em Hibridização Molecular "in situ"

2.1. Hibridização "in situ" com sondas marcadas com biotina:

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM PAPILOMAVÍRUS (DNA) CONJUGADO COM BIOTINA Amplificação pelo CSA)

Desparafinização

- | | |
|---------------------------------------|--------|
| 1. Xilol a 60°C | 15 min |
| 2. Xilol T.A. | 15 min |
| 3. ETOH 100% 3 x | 1 min |
| 4. ETOH 95% | 30 seg |
| 5. ETOH 80% | 30 seg |
| 6. Lavar em água corrente e destilada | |

Microondas

- | | |
|--|--------|
| 7. Colocar as lâminas no microondas em cubas contendo tampão citrato 10 mM pH 6,0. | 5 min |
| 8. Esperar a solução esfriar | 20 min |
| 9. Lavar em água corrente e destilada | 3 min |
| 10. Bloqueio da peroxidase endógena com H ₂ O ₂ 3 vezes | 15 min |
| 11. Lavar em água corrente e destilada | 5 min |

Digestão do tecido

- | | |
|---|-------|
| 12. Proteinase K (25 µg/ml em PBS pH 7,4) a 37° C | 5 min |
| 13. PBS pH 7,4 | 5 min |

14. ETOH 100%	1 min
15. Secar ao ar	
Denaturação e Hibridização	
16. Colocar a sonda HPV-DNA (kit DAKO) na lâmina, cobrir com lamínula, deixar a 95° C para denaturar	10 min
17. Esfriar rapidamente e incubar em câmara úmida a 37° C	overnight
Lavagem "stringent"	
18. Remover lamínulas em tampão A (Tris-HCl 0,05M pH 7.4) à TA	3 min
19. Lavar em solução "stringent" (kit DAKO), diluída 1/50 em H ₂ O destilada, pré-aquecida a 37° C, 2 vezes	30 min
20. Lavar em tampão A	5 min
Amplificação e Revelação	
21. Incubar com Strepto-ABC (kit CSA, DAKO), diluído 1/400 em tampão diluente a 37° C	15 min
22. Lavar com tampão A 2 vezes	5 min
23. Incubar com Biotinil-Tiramida (kit CSA, DAKO), a 37° C	5 min
24. Lavar com tampão A 2 vezes	5 min
25. Incubar com Strepto-Peroxidase (kit CSA, DAKO), a 37° C	15 min
26. Lavar com tampão A 2 vezes	5 min
27. Revelar com diaminobenzidina-H ₂ O ₂	5 min
28. Lavar em água corrente e destilada	5 min
29. Contracorar com Hematoxilina de Harris	1 min
30. Lavar, desidratar, montar	

2.2. Hibridização "in situ" com sondas marcadas com digoxigenina

2.2.1. Hibridização *in situ* com DNA de VHB conjugado com digoxigenina, utilizando para detecção o Kreatech's Ultra Dig Kit

Desparafinização

1. Xilol a 60°C	15 min
2. Xilol TA	15 min
3. ETOH 100% 3 x	1 min
4. ETOH 95%	30 seg
5. ETOH 80%	30 seg
6. Lavar em água corrente e destilada	

Digestão do tecido

- | | |
|--|-------|
| 7. Proteinase K (25 µg/ml em PBS pH 7,4) a 37° C | 5 min |
| 8. PBS pH 7,4 | 5 min |
| 9. ETOH 100% | 1 min |
| 10. Secar ao ar | |

Denaturação e Hibridização

- | | |
|---|-----------|
| 11. Incubar os cortes com mistura de hibridização (MH) em câmara úmida a 37° C | 30 min |
| 12. Lavar em tampão A (Tris-HCl 0,05M pH 7.4), 2 vezes | 6 min |
| 13. Desidratar em álcool e secar ao ar | |
| 14. Aplicar 10 µl da sonda (1/3 em MH) sobre os cortes, cobrir com lamínula, denaturar o DNA viral do tecido e da sonda a 95° C | 10 min |
| 15. Incubar em câmara úmida a 37° C | overnight |

Lavagem "stringent"

- | | |
|---|-------------|
| 16. Remover lamínulas em tampão A | |
| 17. Lavar em tampão de lavagem (solução pré-aquecida a 37° C, diluída 1/500 em H2O destilada contendo formamida 20%), 3 vezes | 10 min |
| 18. Lavar em tampão A, 2 vezes | 3 min |
| 19. Incubar as lâminas em tampão de bloqueio (kit) | 10 min |
| 20. Escorrer o excesso. Incubar com anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina diluído 1/500 em solução de bloqueio, TA | 30 min |
| 21. Lavar com tampão A, 2 vezes | 3 min |
| 22. Incubar com solução substrato (10µl BCIP; 10µl NBT; 1 ml do tampão de coloração), ao abrigo da luz à TA | 15 a 60 min |
| 23. Descartar a solução substrato e aplicar solução de parar diluída 1/500 em água destilada (kit) | 5 min |
| 24. Lavar em água destilada | |
| 25. Contracorar com Nuclear Fast Red | 1 min |
| 26. Lavar em água corrente e destilada. | 3 min |
| 27. Desidratar e montar as lâminas. | |

2.2.2. Hibridização *in situ* com DNA de *Paracoccidioides brasiliensis* conjugado com digoxigenina

Desparafinização

- | | |
|------------------------------------|--------|
| 1. Xilol a 60°C | 15 min |
| 2. Xilol TA | 15 min |
| 3. ETOH 100% 2 x | 1 min |
| 4. ETOH 95% 2x | 1 min |
| 5. 2x SSC, 2x | 2 min |
| 6. HCl 0,2 N (solução fresca à TA) | 20 min |
| 7. 2x SSC, 2x | 3 min |

Microondas

- | | |
|--|--------|
| 8. Colocar as lâminas no microondas em cubas contendo tampão citrato 10 mM pH 6,0. | 5 min |
| 9. Esperar a solução esfriar | 20 min |
| 10. 2x SSC | 3 min |

Digestão do tecido

- | | |
|--|--------|
| 11. Proteinase K (25 µg/ml em PBS pH 7,4) a 37° C | 5 min |
| 12. 2x SSC, 2x | 5 min |
| 13. Trietanolamina 0,1 M. Colocar 0,6 ml de Anidrido Acético imediatamente após adição das lâminas | 15 min |
| 14. 2x SSC | 5 min |

Pré-hibridização, Denaturação e Hibridização

- | | |
|--|-----------|
| 15. Incubar com tampão de pré-hibridização em câmara úmida a TA | 30 min |
| 16. Denaturar a 95° C | 5 min |
| 17. Hibridização - Secar o tampão ao redor do tecido, colocar a sonda apropriada, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida a TA | overnight |

Lavagem "stringent"

- | | |
|--|--------|
| 18. Remover lamínulas em tampão A (Tris-HCl 0,05M pH 7.4) à TA | |
| 19. Lavar em 2 x SSC pH 7.0 (pré-aquecido a 37° C) | 10 min |
| 20. Lavar em 1 x SSC pH 7.0 (pré-aquecido a 37° C) | 10 min |
| 21. Lavar em 0,5 x SSC pH 7.0 (pré-aquecido a 37° C) | 10 min |
| 22. Lavar em tampão A | 3 min |

- | | |
|---|-------------|
| 23. Incubar com Tampão A contendo BSA 1% e Triton X-100 0,3%, em câmara úmida à TA. | 30 min |
| 24. Escorrer o excesso. Incubar com anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (BOEHRINGER MANNHEIM) diluído 1/200 com Tampão A contendo BSA 1% e Triton X-100 0,3%, à TA | 2 h |
| 25. Lavar com tampão A, 2x | 3 min |
| 26. Lavar com tampão C (Tris base + NaCl + MgCl ₂ pH 9.5) | 3 min |
| 27. Incubar com solução de BCIP / NBT à TA | 15 a 60 min |
| 28. Escorrer excesso de reagente e colocar em tampão C | 5 min |
| 29. Contracorar com Nuclear Fast Red | 1 min |
| 30. Lavar em água corrente e destilada. | 3 min |
| 31. Desidratar e montar as lâminas. | |

3. Reagentes e soluções

3.1. Tampão Tris-HCl 1 M (solução estoque)

Tris-HCl	157,6 g
Água destilada q.s.p.....	1 litro

3.2. Tampão A (Tris-HCl 0,05 M pH 7.4)

Tris-HCl 1 M.....	50 ml
Cloreto de sódio	5,84 g
Água destilada.....	850 ml
Ajustar o pH e completar o volume para 1 litro	

3.3. Tampão C (Tris-base 0,1M pH 9.5)

Tris-base.....	12,11 g
Cloreto de sódio	5,84 g
MgCl ₂ (Hexahidrato).....	5,10 g
Água destilada.....	900 ml
Ajustar o pH e completar o volume para 1 litro	

3.4. 20x SSC (standard saline citrate) - solução estoque

Cloreto de sódio 3M e Ácido cítrico 0,3M

Cloreto de sódio.....	175,30 g
-----------------------	----------

Ácido cítrico, sal trisódico, 2 H ₂ O.....	88,23 g
Água destilada, q.s.p.....	1 litro

3.5. Tampão 2x SSC

20x SSC.....	100 ml
Água destilada q.s.p.....	1 litro
Ajustar o pH para 7.0	

3.6. Tampão 0,5x SSC

20x SSC.....	25 ml
Água destilada q.s.p.....	1 litro
Ajustar o pH para 7.0	

3.7. HCl 1 N

HCl concentrado	75 ml
H ₂ O destilada	825 ml
Adicionar o HCl lentamente na água destilada e ir agitando	

3.8. HCl 0,2 N

HCl 1 N	200 ml
Água destilada	800 ml
Adicionar o HCl lentamente na água destilada e ir agitando.	

3.9. Trietanolamina 0,1 M

Trietanolamina	18,56 g
Água destilada	1000 ml
Misturar bem. pH 8.0 ± 0.2	

3.10. Tampão A com BSA 1% e Triton X-100 0,3%

BSA 10%	1 ml
Triton X-100	30 µl
Tampão A	9 ml

3.11. NBT/BCIP com Levamisole

Levamisole 125 mM	8 µl
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt).....	3.3 µl
NBT (nitroblue tetrazolium chloride).....	4.4 µl
Tampão C	1 ml

Preparar imediatamente antes do uso, misturar lentamente e aplicar nos cortes.

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

Desde os primórdios, quando foi descoberto por Ferdinando Blum em 1893, o formaldeído vem sendo largamente utilizado como fixador até os dias atuais. A formalina apresenta algumas vantagens sobre o álcool, particularmente pela superior preservação de detalhes morfológicos. Desta forma, os critérios para diagnóstico histopatológico têm sido estabelecidos através da observação de cortes de tecido, fixados em formalina e emblocados em parafina, corados por Hematoxilina-eosina.

Os problemas relacionados ao processo de fixação, que incluem atraso na fixação, má penetração do fixador no tecido e fixação excessiva, podem prejudicar a análise imuno-histoquímica. Atraso na fixação pode causar secura da superfície do tecido e resultar em uma pobre morfologia no centro, além de uma coloração imuno-histoquímica falso-positiva na periferia do corte histológico. A má penetração do fixador leva a uma ausência ou fraca coloração, enquanto o excesso resulta em perda de antigenicidade ⁽¹¹⁾.

O clínico/cirurgião responsável pela colheita da amostra, deve garantir a fixação mais adequada. Determinadas substâncias, como antígenos de membrana, apenas se conservam em tecidos imediatamente congelados em nitrogênio líquido ou isopentano. Entretanto, a maioria das reações pode ser realizada em material fixado, tanto em fixadores aditivos (formaldeído), como em fixadores coagulativos (álcool e derivados). Em casos de dúvida, o Laboratório que fará as reações deverá ser consultado antes da colheita tecidual.

Não há um fixador específico que seja utilizado só para imuno-histoquímica, já que alguns determinantes antigênicos (epítomos) resistem a um certo fixador, mas não a outros. A formalina a 10%, fixador à base de formaldeído ⁽¹²⁾, que normalmente é utilizado em laboratórios de Anatomia Patológica, confere excelente preservação morfológica, mas existem alguns critérios que são fundamentais para otimizar o seu uso em imuno-histoquímica, como por exemplo, que a solução de formalina seja tamponada com fosfatos, e o tempo de fixação não deva exceder 24 horas.

As ligações cruzadas das moléculas, causadas pela fixação em formalina, alteram a estrutura terciária dos antígenos, que podem prejudicar as ligações antígeno-anticorpo e, conseqüentemente, a coloração imuno-histoquímica ^(13,14,15). Recuperação antigênica é o termo empregado para o processo pelo qual estas ligações cruzadas entre as moléculas são eliminadas; assim, a reação antígeno-anticorpo pode ser conduzida sem problemas. Os principais métodos, químicos e físicos, de recuperação antigênica descritos são:

- tratamento dos cortes com enzimas proteolíticas, tais como: tripsina, pronase, proteinase K, pepsina, ficina, etc, ^(16,13), em concentrações e tempo de incubação adequados ao tipo de tecido e também do antígeno a ser detectado, devendo cada método ser padronizado para as condições peculiares de cada laboratório.
- Irradiação por microondas em cortes incubados em solução tampão citrato 10 mM / pH6,0 , soluções hiperosmolares de uréia ou com soluções de metais pesados ⁽¹⁷⁾ em forno de microondas ⁽⁸⁾.
- denaturação em calor úmido mediante incubação dos cortes em solução tampão citrato 10 mM /pH 6,0 em panela de pressão ^(18,9).

A digestão enzimática tem a finalidade de restaurar a antigenicidade perdida ou comprometida dos antígenos tissulares, em decorrência do processamento rotineiro de fixação do material para o exame anatomo-patológico.

O uso de digestão enzimática antes da reação imuno-histoquímica tem a finalidade de reduzir sensivelmente a coloração não-específica, enquanto, simultaneamente eleva a imuno-reatividade de alguns antígenos tissulares, permitindo, inclusive, o uso de anticorpos mais diluídos.

O tratamento enzimático, contudo, não aumenta a imuno-reatividade de antígenos com elevado teor de carboidratos como, por exemplo, o antígeno carcinoembrionário (CEA), mas é bastante eficiente para glicoproteínas, tais como imunoglobulinas e hormônios. Deve ser lembrado, ainda, que a pré-digestão nem sempre é necessária ou mesmo desejável, pois a mesma poderá alterar na especificidade de anticorpos monoclonais. O tratamento com digestão enzimática deve ser realizado com cuidado para evitar danos aos tecidos e a exposição excessiva pode enfraquecer a coloração ou criar resultados falso-negativos devido à digestão excessiva da proteína de interesse. Ela pode, ainda, clivar os antígenos, criando fragmentos comuns a muitos outros presentes naquele tecido e, desse modo, aumentar a coloração não-específica ⁽¹⁹⁾.

A determinação do ponto ideal de digestão não é sempre possível, pois a mesma geralmente se baseia em resultados experimentais com combinação de um determinado fixador e um antígeno específico, que nem sempre pode ser generalizado para outras combinações de tempo de fixação, pH e temperatura.

A escolha da protease, sua concentração de uso e tempo de digestão, variam de acordo com o tipo, lote da enzima, grau de fixação do material, antígeno a ser pesquisado, anti-soro a ser utilizado em sua pesquisa; desta forma, é recomendável a padronização para cada laboratório.

Por outro lado, nos anos 40, estudos bioquímicos da reação química entre proteína e formalina indicaram que a hidrólise destas ligações cruzadas é limitada por certas cadeias de aminoácidos (como o imidazol e indol), mas que estas mesmas ligações podem ser revertidas pelo aquecimento a altas temperaturas (120°C) ou tratamento fortemente alcalino. A partir destas observações vem crescendo, na literatura, o número de publicações acerca de protocolos dirigidos para recuperação antigênica, baseados no aquecimento de tecidos a altas temperaturas ⁽²⁰⁾. Estes protocolos começaram a ser desenvolvidos no início dos anos 90, com o intuito de restaurar a imunorreatividade tecidual com vários anticorpos empregando, para isso, a fervura dos cortes histológicos em soluções denaturantes contendo sais metálicos e utilizando forno

de microondas: Estas técnicas de recuperação vêm aumentando drasticamente a qualidade de imuno-reação para muitos anticorpos ^(7,21,22,23).

Vários mecanismos parecem estar envolvidos no processo de recuperação de antígenos através do aquecimento por microondas. Um possível mecanismo para recuperação antigênica pode ser assim resumido ⁽²⁴⁾: **a)** quebra das ligações, induzidas pela formalina, entre epítopos e proteínas não-relacionadas; **b)** extração de proteínas bloqueadoras difusíveis; **c)** precipitação de proteínas; e **d)** re-hidratação dos cortes histológicos, permitindo melhor penetração do anticorpo e aumentando a acessibilidade de epítopos. Outra explicação ⁽⁸⁾ propõe a denaturação de proteínas, com base na observação de que alguns antígenos e a atividade de enzimas endógenas podem ser perdidos após o tratamento. O reconhecimento antígeno-anticorpo depende da estrutura tridimensional da proteína; por esta razão, é provável que o mecanismo da recuperação antigênica se baseia em uma re-modificação da estrutura da proteína modificada pelo formol.

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que se o corte de um tecido fixado mostra imuno-coloração satisfatória sem tratamento, provavelmente a mesma ficará pior após a recuperação. Isto pode significar que, se a estrutura antigênica é formalina-resistente, isto é, sem modificação após fixação, ela pode ser modificada pelo aquecimento, a não ser que a estrutura antigênica seja também resistente ao calor.

Apesar da temperatura elevada ser considerada o mecanismo principal na recuperação antigênica, foi verificada a influência do pH das soluções utilizadas, na qualidade da imuno-coloração ⁽²⁵⁾; a molaridade também é fator importante na eficiência da recuperação antigênica: em geral, a maioria dos sais funcionam melhor se utilizados abaixo de 0,1 M, enquanto sais metálicos são mais eficientes em concentrações mais elevadas ⁽²⁶⁾.

O tampão citrato de 0,01M / pH 6,0 é, atualmente, a solução mais utilizada, por não ser tóxica, de fácil preparo, baixo custo, e aplicável na recuperação de um grande número de antígenos, com resultados consistentes ^(7,21,22,26).

Dentre as maiores consequências que o uso de microondas trouxe podem ser citados ^(7,26):

- uso de anticorpos altamente diluídos, com diminuição da coloração de fundo;
- aparecimento de coloração, anteriormente inexistente e, com isso, a necessidade da reconsideração do seu significado biológico;
- a redução das diferenças de coloração entre materiais fixados com formalina em diferentes tempos de duração;
- a redução do efeito de "zona" (intensidades diferentes de coloração nas bordas e no centro dos cortes).

Uma das possíveis causas da ineficiência na recuperação antigênica com o uso de microondas seria a ocorrência de pontos quentes e frios, fenômeno particularmente presente quando são aquecidas grandes baterias de lâminas. Enquanto a exposição de antígenos varia de adequada a ótima na maioria dos cortes, ocasionalmente algumas lâminas mostram que a recuperação não foi atingida. Alguns estudos trouxeram evidência de que o aquecimento em panela de pressão pode eliminar as variações entre

baterias, observadas com o uso de microondas, e a possibilidade de manipular, simultaneamente, um grande número de lâminas em um período menor de tempo ^(9,27).

O tratamento enzimático ainda é utilizado em alguns casos, mas os dois métodos, enzimático e aquecimento, em conjunto, são raramente empregados e não recomendados ⁽²²⁾. Em algumas situações, a digestão enzimática conduz a um nível de coloração de fundo intolerável, dificultando a interpretação diagnóstica ⁽¹³⁾. Em muitos casos, a técnica baseada no uso de microondas é preferível à que emprega a digestão enzimática, pois verificam-se variações lote-a-lote quanto à eficácia, além da limitada vida útil da enzima. Em muitos laboratórios, com o aumento da demanda de exames imuno-histoquímicos observada atualmente, o emprego da panela de pressão vem sendo visto como alternativa bastante atraente, pois além de ser um método simples, ele é relativamente seguro, barato, consome menor período de tempo e mais confiável que o aquecimento pelo forno de microondas.

AMPLIFICAÇÃO E ACENTUAÇÃO DA REVELAÇÃO

O patologista/investigador, após verificar os efeitos da fixação química, do processamento e dos tratamentos de recuperação antigênica, precisa, agora, decidir qual sistema de detecção será utilizado em sua pesquisa.

O propósito de qualquer sistema de detecção em imuno-histoquímica, como as técnicas imuno-enzimáticas, é auxiliar na visualização de pequenas quantidades de um tipo celular em particular ou um antígeno tissular e produzindo, ao mesmo tempo, o mínimo de "background".

As técnicas imuno-enzimáticas reúnem a imuno-reatividade de anticorpos e as propriedades químicas de enzimas, que reagem com substrato-cromogênico incolor para produzir produto final colorido. As primeiras técnicas empregavam o método direto, que consistia na conjugação da enzima diretamente ao anticorpo específico (primário). A partir do desenvolvimento dos métodos indiretos, houve significativa melhora na sensibilidade das técnicas imuno-histoquímicas; neste método de duas etapas, a enzima está conjugada a um segundo anticorpo (secundário), que irá reagir com o anticorpo primário.

A introdução dos métodos não-conjugados, os complexos Peroxidase-anti-peroxidase (PAP) e avidina-biotina-peroxidase (ABC), trouxe grande avanço à imuno-histoquímica. No método PAP, o anticorpo secundário funciona como "ponte de ligação" entre o anticorpo primário e o complexo PAP; no método ABC, o anticorpo secundário biotilado irá se ligar ao complexo avidina-biotina que, por sua vez, já se encontra ligado à enzima peroxidase. Quando comparados os dois métodos, o complexo ABC demonstra sensibilidade superior ao complexo PAP. Uma variante do método ABC, a estreptavidina ligada à biotina (LSAB) demonstrou ser de 4 a 8 vezes mais sensível que o ABC ⁽²⁸⁾.

Alguns sistemas de detecção vêm sendo desenvolvidos visando eliminar os problemas com coloração não-específica resultante de atividade de proteínas endógenas. Por exemplo, enzimas ligadas a polímero conjugado ao anticorpo secundário, como o kit EnVision manufaturado pela Dako. Neste método, a coloração não é afetada pela interferência de atividade da biotina endógena presente em alguns tecidos como, por exemplo, o hepático, o renal e o linfóide, sendo a intensidade de coloração até 20 vezes superior à obtida pelo método PAP.

Outros métodos conseguem um aumento de 30 a 200 vezes no sinal de amplificação, mediante deposição covalente de moléculas de biotina, descrito inicialmente por Bobrow et al. ⁽²⁹⁾, para melhorar a eficiência do sistema de detecção avidina-biotina no ensaio em fase sólida e mais tarde utilizado para imuno-histoquímica por Adams ⁽³⁰⁾ e Kina ⁽³¹⁾. Neste sistema, denominado CSA (catalysed signal amplification), fabricado pela Dako, a peroxidase catalisa a deposição de um componente fenólico biotinilado (biotinil tiramida), que irá se ligar à estreptavidina-peroxidase. O procedimento completo se processa da seguinte forma:

- ① o anticorpo primário reage com antígeno presente no tecido;
- ② o anticorpo secundário biotinilado liga-se ao anticorpo primário;
- ③ o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase liga-se à biotina do anticorpo secundário;
- ④ a peroxidase presente na reação catalisa a precipitação local de biotinil tiramida;
- ⑤ a estreptavidina conjugada à peroxidase liga-se à biotina depositada na reação catalisada pela peroxidase (do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase).

Este sistema de detecção é ideal para quantidades pequenas de antígeno e tem especial aplicação na reação de hibridização molecular "in situ".

O sinal produzido pelo produto final da reação com a diaminobenzidina (DAB) pode ser intensificado pela prolongação da reação da peroxidase, mas, após um período de tempo, a coloração de fundo ("background") também pode aumentar. Existem alternativas, como a incorporação de metais pesados à solução-substrato, o pós-tratamento com tetróxido de ósmio e as exposições repetidas ao cromógeno ⁽¹⁹⁾.

A adição de íons metálicos, em concentração a 1% (NiCl₂, CoCl₂, CuSO₄, etc.) proporciona, além da intensificação, a modificação da cor do produto da reação ⁽³²⁾, tornando-se um procedimento útil nas técnicas de dupla coloração. Os íons níquel são particularmente úteis para membrana e outras colorações delicadas, como projeções celulares e fibras nervosas. Íons cobalto e níquel podem ser empregados para intensificar também a coloração citoplasmática. Ao contrário do ósmio, estes dois íons não aumentam o "background".

A razão DAB: Ni: H₂O₂ é muito importante para uma boa qualidade da coloração e deve ser determinada experimentalmente de acordo com as condições de trabalho de cada laboratório. Em tecidos congelados, por exemplo, a fórmula que se segue tem sido empregada com sucesso para coloração de membrana ⁽³³⁾:

- 100 mg de DAB
- 1 ml de NiCl₂ a 8% em H₂O
- 25 µl de H₂O₂ a 3%
- dissolver o DAB em 200 ml de tampão Tris, filtrar e adicionar a solução de cloreto de níquel e, imediatamente antes do uso, o H₂O₂.

Alguns sais dispensam a presença de H₂O₂, como o sulfato de níquel e o nitrato de prata, que são capazes de catalizar a oxidação do DAB.

O tetróxido de ósmio tem alta afinidade pelo produto da reação enzimática com o DAB; seu emprego pós-coloração escurece o produto da reação do DAB e previne o fenômeno de "desbotamento" que ocorre durante o arquivamento por longo tempo. A

desvantagem está no escurecimento concomitante do "background". Existem vários protocolos de pós-coloração com ósmio ⁽¹⁹⁾:

- tratamento com solução de tetróxido de ósmio a 2%, por vários minutos;
- tratamento com solução de tetróxido de ósmio a 1% em PBS 0,1M / pH7,4;
- exposição dos cortes histológicos aos vapores de tetróxido de ósmio, por 10 a 15 minutos, seguindo-se lavagens em PBS;
- tratamento com solução de tetróxido de ósmio a 0,05%, por 10 a 15 segundos.

Alguns compostos nitrogenados, como o imidazole, contribuem para a oxidação do DAB pela peroxidase, inibindo, inclusive, a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina. A adição de imidazole 0,01M à solução de DAB, em algumas situações, aumenta tanto a sensibilidade como a eficiência na detecção do antígeno.

Em resumo, o produto final da oxidação do DAB pode ser intensificado por vários agentes químicos. Entretanto, nem sempre o aumento da intensidade de coloração é comensurado com aumento de sensibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cunha MMPL. Organização e Administração. In: Ministério da Saúde. Manual de Laboratório cito-histopatológico, 1987, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, Brasília, DF, p. 7-10.
2. Giesbrecht E. Experiências de química: técnicas e conceitos básicos 1979; São Paulo, Ed. Moderna Ltda., P. 3-5.
3. Boenisch T In: Naish SJ, ed. Handbook of immunochemical staining methods Dako Corporation, Carpinteria, 1989.
4. Rentrop M, Knapp B, Winter H, Schweizer J. Alminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. Histochemistry 1986; 18: 271-276.
5. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of solubel antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 1970; 18: 315-333.
6. Hsu SM; Raine L Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. J. Histochem. Cytochem. 1981; 29: 577-580.
7. Gown AM, Wever N, Battifora H: Microwave-based antigenic unmasking - A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. Appl. Immunohistochem. 1993; 1: 256-266.
8. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MHG, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J, Rilke F. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. J. Pathol. 1993; 171: 79-80.
9. Miller K, Auld J, Jessup E, Rhodes A, Ashton-Key M. Antigen unmasking in formalin-fixed routinely processed paraffin wax-embedded sections by pressure cooking: A comparison with microwave oven heating and traditional methods. Advances Anat.Pathol. 1995; 2: 60-64.
10. Brigatti DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalhoz B, Travis SZ, Fong CKY, Hsiung GD, Ward DC. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. Virology 1983; 126: 32-50.
11. Weiss LM & Chang KL. Practical applications of immunohistochemistry (Handout of Short Course # 65) 1997; The United States and Canadian Academy of Pathology, Duarte - CA.
12. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldeyde fixation. J. Histochem. Cytochem. 1979; 33:845-853.
13. Battifora H & Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. J.Histochem.Cytochem. 1986; 34: 1095-1100.
14. Leong ASY & Gilham PN. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. Pathology 1989; 21: 266-268.
15. Taylor CR & Cote RJ. Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist, 2nd. Ed., Philadelphia, WB Saunders, 1994.
16. Huang S, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining in paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab. Invest. 1976; 35: 383-391.
17. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 1991; 39: 741-748.

18. Norton AJ, Jordan S, YEOMANS, P. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J. Pathol.* 1994; 173: 371-379.
19. Elias JM. *Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis* 1990; Chicago, ASCP Press.
20. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present and future. *J. Histochem. Cytochem.* 1997; 45: 327-343.
21. Gown AM, A.M. Heat-induced epitope retrieval in diagnostic pathology (HIER). In: *Curso Curto em Imunohistoquímica, XXI Congresso Brasileiro de Patologia* 1997; Brasília – DF.
22. Leong ASY & Millios J. An assessment of the efficacy of the microwave antigen-retrieval procedure on a range of tissue antigens. *Appl. Immunohistochem.* 1993; 1: 267-274.
23. Taylor CR; Shi SR, Cote RJ. Antigen retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization. *Appl. Immunohistochem.* 1996; 4: 144-166.
24. Suurmeijer AJH & Boon ME. Notes on the application of microwaves for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections. *Eur. J. Morphol.* 1993; 31: 144-150.
25. Shi SR, Iman SA, YOUNG, L.; Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 1995; 43: 193-201.
26. Cattoretti G & Suurmeijer, AJH. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: A review. *Adv. Anat. Pathol.* 1995; 2: 2-9.
27. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone A, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: Comparison of different methods. *J. Pathol.* 1997; 183: 116-123.
28. Giorno R. A comparison of two immunoalkaline phosphatase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn. Immunol.* 1984; 2: 161.
29. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ; Litt GJ. Catalysed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods* 1989; 125: 279-285.
30. Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.* 1992; 40: 1457-1463.
31. King G, Payne S, Walker F, Murray GI. A highly sensitive detection method for immunohistochemistry using biotinylated tyramine. *J. Pathol.* 1997; 183: 237-241.
32. Hsu SM & SOBAN, E.: Color modification of diaminobenzidine (DAB): Precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1982; 30: 1079-1082.
33. Hsu SM & Raine L. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in diagnostic and research pathology. In: DE LELLIS, R.A., ed. *Advances in Immunohistochemistry* 1984; Masson Publ., New York, U.S.A., p. 31-42.

22. GLOSSÁRIO DOS PRINCIPAIS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Evandro Sobroza de Mello e Venancio A. F. Alves

Estão aqui listados os principais antígenos e, entre parênteses, os anticorpos (clones) mais usados. Algumas peculiaridades destes anticorpos, em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, são comentadas.

Actinas - as actinas são microfilamentos citoplasmáticos, com vários isotipos com diferentes especificidades celulares - actinas alfa, presentes em células musculares, actinas beta em células não musculares e actinas gama, presentes tanto em células musculares quanto não musculares. Usualmente, para diagnóstico, apenas as actinas musculares têm utilidade.

Actina alfa de músculo liso (1A4) - reage com o isotipo alfa da actina de músculo liso, não reagindo com a actina de células musculares esqueléticas ou cardíacas ou com actina de células não musculares. Em tumores, costuma ser útil na determinação de diferenciação muscular lisa, miofibroblástica ou mioepitelial. Reações intensas e difusas costumam ser consideradas como evidência de diferenciação para músculo liso. Em casos morfológicamente sugestivos de leiomiossarcoma, sua positividade pode ser útil neste diagnóstico mesmo diante da negatividade para desmina.

Actina muscular (HHF35) - reconhece os isotipos alfa e gama das actinas musculares, mas não as actinas não musculares. Marca, portanto, células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas, leiomiossarcomas e rabdomiossarcomas. Como o 1A4, também marca células miofibroblastos, células mioepiteliais e pericitos, freqüentemente desmina-negativos. Grande parte dos investigadores relata alta sensibilidade e especificidade deste marcador para o diagnóstico de rabdomiossarcoma.

Actina sarcomérica, alfa-sr-1 (5C5) - reage com cadeias alfa de actina de músculo estriado esquelético e cardíaco, sendo usada como um marcador de rabdomiossarcoma. Como há relatos de eventual reação cruzada com músculo liso, deve ser usado em painel contendo também 1A4.

Alfa-1 anti-tripsina (policlonal) e alfa-1 anti-quimiotripsina (policlonal) - apesar de pouco específicas, podem ser usadas como marcadores histiocitários, principalmente das formas macrofágicas, juntamente com a lisozima. Tumores hepatocitários e de células germinativas (em especial o tumor do saco vitelino) também costumam ser positivos. Os preparados para alfa-1 anti-tripsina também são usados em biópsias hepáticas no diagnóstico de síndrome de deficiência desta enzima, onde pode-se detectar seu acúmulo de anômalo.

Alfa-fetoproteína (policlonal) - proteína oncofetal, presente em tumores de células germinativas com diferenciação para saco vitelino. Tumores hepatocelulares também são usualmente positivos, assim como os raros adenocarcinomas de tipo hepatóide.

Antígeno epitelial (Ber-EP4) - reage com glicoproteínas presentes na superfície e no citoplasma de todas as células epiteliais, exceto as células mais superficiais do epitélio escamoso, hepatócitos e células parietais. Não reage habitualmente com células mesoteliais, e por isso sua principal utilização tem sido no diferencial mesotelioma X carcinoma. Como alguns carcinomas são negativos e alguns mesoteliomas são positivos para este antígeno, deve ser sempre usado em painel.

Antígeno renal nefrogênico proximal, marcador de carcinoma de células renais (66.4.C2) - marca uma glicoproteína de 200 kD, localizada na borda em escova do epitélio dos túbulos proximais do rim. Está presente em 80-90% dos carcinomas renais primários e metastáticos. Também os lóbulos mamários, epididimal e tireoidiano, e seus respectivos tumores, podem ser positivos.

BRST-2, GCFDP-15 (D6) - é produzido por epitélio apócrino da mama, glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas, glândulas salivares menores, glândulas brônquicas e seus tumores. Mais da metade dos carcinomas primários e metastáticos da mama expressam este antígeno, bem como a Doença de Paget extra-mamária. Um número pequeno de carcinomas originados em outros órgãos que não a mama podem ser positivos para este marcador. No entanto, sua positividade é um forte indicador de origem mamária em um carcinoma de sítio primário desconhecido. Lembrar que as reações para este antígeno são freqüentemente fracas e focais.

CA125, antígeno de câncer ovariano (OV125:1) - positivo na maioria dos carcinomas primários de ovário, principalmente nos serosos, e em menor proporção nos mucinosos, podendo ser usado na pesquisa de sítio primário de carcinoma. Freqüentemente é positivo em outros carcinomas, principalmente nos ginecológicos.

CA19-9, sialil Lewis^a - marcador que reage com uma pentose na superfície celular. Usualmente um marcador para carcinoma de pâncreas e tubo digestivo, mas apresenta positividade freqüente em outros carcinomas.

Cadeias leves de imunoglobulina, kappa e lambda (policlonais) - úteis para a demonstração de restrição de cadeias leves (desproporção maior do que 1:10 no número de células marcadas a favor de uma das cadeias leves), achado indicativo de monoclonalidade em uma proliferação de linfócitos B, portanto favorecendo um diagnóstico de neoplasia. À exceção dos casos em que há diferenciação plasmocitária, freqüentemente é difícil de demonstrar.

Calcitonina - anticorpos contra este polipeptídeo são usados no diagnóstico de proliferações de células C (parafoliculares) da tireóide, principalmente no diferencial entre carcinoma medular e folicular da tireóide.

Catepsina D - complexo de glicoproteínas de aparente ação mitogênica, cuja expressão é regulada pelo estrogênio, mais frequentemente é usada em baterias prognósticas para carcinoma de mama, apesar de seu valor para tanto ser controverso. Uma aplicação possível é na detecção de células ganglionares na parede intestinal.

CD1a (O10) - é uma glicoproteína de superfície relacionada ao MHC classe I, expressa em associação com a beta 2 microglobulina. Marcador das células da histiocitose de células de Langerhans, cuja positividade é exigida para um diagnóstico definitivo. Outras proliferações histiocitárias costumam ser negativas, apesar das células da Doença de Rosai-Dorfman poderem apresentar positividade.

CD3, linfócitos T (policlonal) - molécula ligada ao receptor de células T, é um dos marcadores mais sensíveis e específicos para demonstração de diferenciação T.

CD5 (CD5/54/F6): glicoproteína presente na superfície da sub-totalidade dos linfócitos T. Paradoxalmente, pode ser demonstrado em dois tipos de linfomas B: linfoma de células do manto e linfoma/leucemia linfocítica B (B-CLL), onde pode ser usado na consolidação destes diagnósticos.

CD15, antígeno associado aos granulócitos (Leu-M1; C3D-1; BG-7) - reage com um antígeno encontrado em granulócitos maduros (hapteno X). Marca neutrófilos e células dendríticas, mas não linfócitos e macrófagos. É positivo nas células neoplásicas em um alto percentual dos casos de Doença de Hodgkin, e num percentual muito pequeno de linfomas não Hodgkin. Pode também ser usado no painel para diagnóstico diferencial mesotelioma X adenocarcinoma, já que uma fração dos adenocarcinomas são positivos e os mesoteliomas são negativos para este antígeno.

CD20, linfócitos B (L26) - o melhor e mais usado marcador pan-B, altamente específico e sensível. No desenvolvimento dos linfócitos B aparece logo após o aparecimento do CD19. Importante lembrar que linfócitos B com diferenciação plasmocitária são negativos para CD20, e podem ser positivos para CD45RO, o que pode levar a um diagnóstico errôneo de linfoma T.

CD23 (BU38): este é um receptor de imunoglobulina E que é expresso durante a ativação dos linfócitos B. Sua utilidade diagnóstica principal está na diferenciação da B-CLL (positividade em mais de 90% dos casos) e do linfoma de células do manto (quase sempre negativo). Deve, portanto, ser incluído nas baterias para linfomas de células B de baixo grau.

CD30, antígeno Ki-1 (Ber-H2) - é expresso pelas células neoplásicas de quase todos os casos de Doença de Hodgkin (à exceção do tipo predominância linfocitária, que pode não apresentar marcação), pela maioria dos linfomas anaplásicos de grandes células e por uma proporção variável de linfócitos T e B ativados. Outros tipos de linfoma não-Hodgkin raramente são positivos. Neoplasias de natureza não linfóide, das quais o exemplo mais notável é o carcinoma embrionário, também podem ser positivas.

CD31, células endoteliais (JC/70A) - glicoproteína expressa em células endoteliais, plaquetas, megacariócitos, granulócitos, monócitos, e subpopulações de linfócitos T e B. Tem sido considerado o marcador mais específico e sensível para tumores vasculares benignos e malignos, sobrepujando em sensibilidade o fator VIII e em especificidade o CD34. Em nossas mãos, o CD34 tem se mostrado mais sensível do que o CD31.

CD34, células endoteliais (QB-END/10) - marcador de células hematopoiéticas primitivas e de células endoteliais. Além dos tumores vasculares benignos e malignos, o dermatofibrossarcoma protuberans, os tumores estromais gastrointestinais e o tumor fibroso solitário são caracteristicamente CD34 +.

CD43 - marcador muito sensível para células T, apresenta importante coexpressão com marcadores B nos linfomas B de baixo grau, basicamente os do tipo LLC e linfoma de células do manto.

CD45, antígeno leucocitário comum, LCA (PD7/26 e 2B11) - glicoproteína transmembrânica restrita aos leucócitos, é usada como um marcador genérico de linfomas altamente específico. Sua sensibilidade nos linfomas de baixo grau é alta, mas nos linfomas de alto grau cai para cerca de 80%. Aproximadamente 40% dos linfomas anaplásicos Ki-1+ podem ser negativos para LCA.

CD45RA, células B (4KB5) - isoforma de alto peso molecular do CD45, é usada como um marcador de linfócitos B, apesar de marcar algumas subpopulações de células T normais e alguns poucos linfomas T. As reações para este antígeno costumam ser mais fracas do que para o CD20.

CD45RO, células T (UCHL-1) - variante de baixo peso molecular do CD45, altamente sensível e específico para linfomas T de baixo grau, apresenta um grau menor de ambos os parâmetros (cerca de 80%) nos linfomas T de alto grau. É freqüente a sua coexpressão em linfomas B.

CD57, Leu-7 (HNK-1) - inicialmente desenvolvido como marcador de células natural-killer, mais freqüentemente o temos usado em conjunto com outros anticorpos como marcador neuro-endócrino e de proliferações de células de Schwann.

CD68, macrófagos (KP1) - reconhece epítomos em grânulos lisossômicos, sendo encontrado no citoplasma de histiócitos, células mielóides e macrófagos, marcando tumores histiocíticos e mielóides. É portanto um pan-marcador histiocítico, com alta sensibilidade, mas pouco específico: apresenta reatividade citoplasmática em "dot" na maioria dos linfomas de células B de baixo grau; vários carcinomas também podem ser positivos.

CD74 - marcador citoplasmático, cora histiócitos e linfócitos B, principalmente as células da zona do manto e do centro folicular.

CDw75 - marcador citoplasmático e de superfície, cora linfócitos centro-foliculares normais e neoplásicos. Alguns imunoblastos e linfomas B imunoblásticos também são positivos.

CD79alfa (HM57): polipeptídeo que faz parte do complexo receptor de antígeno dos linfócitos B, útil na marcação de linfomas B com extensa diferenciação plasmocitária, onde o CD20 torna-se negativo e este antígeno mantém-se presente e pode ser demonstrado no citoplasma numa parte dos casos.

CD99, p30/32, MIC2 (HBA71, O13, 12E7) - é encontrado em virtualmente todos os sarcomas de Ewing e na grande maioria dos tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos (PNETs), além de muitos linfomas linfoblásticos. Outros tumores de pequenas células usualmente são negativos.

CEA, antígeno carcinoembrionário (A5B7, 85A12) - marcador epitelial, usado na caracterização do sítio de origem de uma variedade de carcinomas. Os preparados policlonais são úteis na marcação da borda luminal do canalículo biliar em hepatocarcinomas.

Células mesoteliais (HBME-1) - marca células mesoteliais normais, mas habitualmente não células dos diferentes epitélios. Produz um padrão de marcação de membrana na maior parte dos mesoteliomas, mas um percentual significativo de adenocarcinomas de sítios variados também apresenta reatividade, apesar de usualmente citoplasmática.

Ciclina D1: marcador nuclear de muita utilidade na confirmação do diagnóstico do linfoma de células do manto, onde relata-se positividade em mais de dois terços dos casos, diferenciado-o dos demais linfomas de células B de baixo grau. Recomendamos o uso de EDTA como tampão durante a recuperação de epítomos para obtenção de resultados mais homogêneos.

Citoqueratinas - São os marcadores epiteliais de eleição, tendo sua principal utilidade em baterias para neoplasias indiferenciadas. Constituem-se de 20 tipos diferentes, que podem ser utilizados na caracterização dos carcinomas como de origem glandular ou escamosa bem como na tentativa de indicar um sítio primário para tumores metastáticos.

Citoqueratinas, coquetel (AE1/AE3) - este é o preparado mais amplamente usado na demonstração da natureza epitelial de tumores morfológicamente indiferenciados. Praticamente todos os carcinomas são positivos para AE1/AE3. Importantes exceções são os tumores do córtex adrenal e o carcinoma hepatocelular, que expressam apenas citoqueratinas 8/18. Alguns sarcomas (sarcoma epitelíóide e sarcoma sinovial) também são caracteristicamente positivos para AE1/AE3 e para outros preparados de citoqueratinas, bem como mesoteliomas e uma fração dos meningiomas.

Citoqueratinas 1, 5, 10, 11 e 14 (34BE12) - citoqueratinas de alto peso molecular, características de epitélio escamoso e de epitélios ductais. Não reage com epitélios simples (como epitélios de glândulas endócrinas, hepatócitos, ácinos pancreáticos, túbulos proximais do rim ou glândulas endometriais) ou com os tumores correspondentes. Uma utilização crescente deste preparado tem sido na detecção de células basais nas glândulas prostáticas, para diagnóstico diferencial entre carcinoma e hiperplasia prostática.

Citoqueratina 8 (35BH11) - citoqueratina de baixo peso molecular, característica de epitélio simples de ácinos e ductos glandulares, mas ausente nos epitélios escamosos. Espera-se reatividade correspondente nos carcinomas, ou seja, positividade apenas nos carcinomas não escamosos. A combinação dos resultados de citoqueratinas de alto e baixo peso molecular, portanto, permite determinar a origem de um carcinoma em um epitélio simples, ductal ou escamoso.

Citoqueratinas 8 e 18 (CAM 5.2) - par de citoqueratinas de baixo peso molecular, esperando-se reatividade similar a do 35BH11.

Citoqueratina 7 (OVTL 12/30) - citoqueratina de baixo peso útil na distinção de determinados grupos de adenocarcinomas: carcinomas de ovário, pulmão, mama e de células transicionais costumam ser positivos, enquanto carcinomas de tubo digestivo e próstata são negativos.

Citoqueratina 20 (IT-K_s 20.8) - citoqueratina de alto peso caracteristicamente positiva em carcinomas do tubo digestivo, sendo portanto útil quando usada em conjunto com a citoqueratina 7 em baterias para determinação de sítio primário de carcinoma metastático. Tipicamente marca também os carcinomas de células de Merckel.

GFAP, proteína acídica fibrilar glial (policlonal) - filamento intermediário característico dos astrócitos. Astrócitos normais, reativos e neoplásicos usualmente reagem com esse marcador, enquanto oligodendrócitos, células ganglionares, neurônios, células meningoteliais, fibroblastos e tumores derivados destas células costumam ser negativos.

HCG, gonadotrofina coriônica humana (policlonal) - marcador de diferenciação sinciotrofoblástica, em tumores de células germinativas, usado para identificar componente coriocarcinomatoso em tumores mistos.

Hormônios - grande número de hormônios e aminas vasoativas (serotonina, gastrina, somatostatina, GH, ACTH, glucagon, etc.) podem ser marcados de forma satisfatória em material parafinado, e são úteis na caracterização de neoplasias endócrinas e neuroendócrinas.

Infecção, marcadores de doenças infecciosas - numerosos marcadores para doenças infecciosas estão em constante desenvolvimento. Os mais comumente usados em nosso laboratório são aqueles para diferentes antígenos dos vírus da hepatite B, C e delta, leishmania, micobacterias, HSV, EBV e adenovírus, entre outros. A garantia de qualidade destas reações freqüentemente é problemática, pois muitos destes anticorpos não são comerciais e sua padronização é difícil.

Ki-67, antígeno nuclear (MIB-1) - Marca uma proteína presente em todas as fases do ciclo celular, menos na fase G₀, tendo uma relação direta com a fração de crescimento de uma população celular. Em imuno-histoquímica, é o melhor marcador de proliferação celular atualmente disponível.

Lactalbumina alfa (policlonal) - entre 1/3 e 2/3 dos carcinomas de mama expressam este antígeno, o que via de regra reflete-se em suas metástases. Outros tumores, incluindo tumores de anexo cutâneo e tumores de glândula salivar, também podem apresentar positividade para este marcador.

Lactoferrina (policlonal) - usado para identificação de carcinomas de origem mamária. É um marcador bastante específico, apesar de pouco sensível.

MAC 387 - reconhece proteínas ligadoras de cálcio, usado para reconhecimento de células mielóides e histiocíticas. Apesar de bastante sensível, pode ser expresso também em carcinomas, melanomas e sarcomas variados.

Macrófago (HAM56) - marcador histiocitário com reatividade de padrão similar ao CD68. É positivo em células endoteliais.

Melanoma (HMB45) - reage com um oligossacarídeo presente nos pré-melanossomas. Marca as células do componente juncional de nevos melanocíticos, mas não o componente intradérmico ou melanócitos normais. É altamente específico para diferenciação melanocítica em tumores malignos. Com os preparados de sobrenadante de cultura tecidual, não parecem ocorrer falsos-positivos.

Mioglobina - hemoproteína carreadora de oxigênio. É considerada um marcador específico de diferenciação muscular estriada, mas sua utilidade está limitada por marcar preferencialmente rbdomioblastos já com diferenciação morfológica. As actinas musculares e a desmina tendem a ser expressas em um número maior de rbdomiossarcomas do que a mioglobina.

MyoD1, proteína (5.8A) - proteína reguladora miogênica, expressa por células embrionárias desde fases precoces de diferenciação muscular, mostrando-se útil em rbdomiossarcomas. Tem mostrado excelentes resultados com a recuperação de epítomos pelo calor. Marcação nuclear parece ser altamente específica (e também bastante sensível) de rbdomiossarcoma. Atenção - tumores não miogênicos de pequenas células freqüentemente expressam positividade citoplasmática fibrilar. Nos rbdomiossarcomas pleomórficos, os resultados tem sido igualmente satisfatórios. Outro marcador com características similares é a **miogenina**.

Neuroblastoma, marcador de (NB84a) - anticorpo que reconhece uma proteína de 57 kD, produzido a partir de neuroblastoma. Marca a maior parte dos neuroblastomas, mas também costuma ser positivo nos sarcomas de Ewing e PNET.

Neurofilamentos (NR4) - filamentos intermediários com expressão limitada às células neuronais. Podem ser usados na evidenciação de difereciação neuronal ou neuroendócrina, e são úteis no diagnóstico de neuroblastoma.

PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular (PC10; 19A2) - marca uma proteína acessória da polimerase delta, sendo essencial para a síntese de DNA (tanto na proliferação celular quanto na síntese de DNA relacionada ao reparo), variando sua quantidade nas diferentes fases do ciclo celular, com um pico na fase S. A proporção de células positivas para este antígeno em um tumor tem relação com sua fração de crescimento. Como não desaparece tão rapidamente após a saída da célula do ciclo celular, tem uma tendência a marcar um número maior de células do que o Ki-67.

PLAP, fosfatase alcalina placentária (8B6) - isoenzima da fosfatase alcalina que é produzida pela placenta no terceiro trimestre da gravidez. Marca toda a gama de neoplasias de células germinativas (e também as formas "in situ"). Importante salientar que carcinomas de diferentes tipos também podem apresentar positividade. A reação de fundo pode ser um problema na interpretação de casos com reatividade fraca.

Colágeno-tipo IV (CIV22) - pode ser usado na diferenciação de tumores de músculo liso e de bainha neural de outros tumores fusocelulares. O seu uso na detecção de pequenos focos de invasão em carcinomas parece ser limitado, pois a presença de focos de descontinuidade da membrana basal evidenciados por imunohistoquímica não pode ser considerada como evidência definitiva de invasão.

Cromogranina (A11; PHE5; DAK-A3) - proteína componente dos grânulos secretórios de células endócrinas e neurônios. Sua maior utilidade prática é na detecção de tumores com diferenciação neuroendócrina.

D11 - marcador de tumores hepatocelulares e do córtex adrenal. Tem especial utilidade no diagnóstico diferencial entre carcinoma do córtex adrenal e feocromocitoma, pois é positivo na maior parte dos casos destes carcinomas e negativo no feocromocitoma.

Desmina (DE-R-11; D33) - filamento intermediário de células musculares. É o marcador mais específico para diferenciação muscular em tumores, pois não marca células mioepiteliais e miofibroblastos. A baixa sensibilidade previamente alegada para os rabdomiossarcomas parece superada pelas técnicas atuais de recuperação antigênica. Já os leiomiiossarcomas extra-uterinos são freqüentemente negativos.

EMA, antígeno de membrana epitelial (E29) - marcador de diferenciação epitelial, presente em uma grande parte dos adenocarcinomas, mas de forma mais significativa nos carcinomas de mama e de glândulas sudoríparas. Os carcinomas de células escamosas tendem a ter uma reatividade tênue e focal. O anticorpo também marca algumas neoplasias linfóides, particularmente o linfoma anaplásico de grandes células CD30+.

Enolase neurônio-específica, NSE (BBS/NC/VI-H14) - reage com a isoforma gama-gama da enolase. Comumente usada como marcador neuro-endócrino. Apesar da alegada maior especificidade dos preparados monoclonais, a elevada taxa de positividade em tumores com evidências de outra linha de diferenciação tem limitado o seu uso.

Fator VIII (F8/86) - anticorpo altamente específico para demonstração de diferenciação vascular, podendo ser usado em neoplasias pouco diferenciadas com este fim. No entanto, tem sido sobrepujado em sensibilidade pelo CD34 e CD31.

Fosfatase ácida prostática (policlonal) - enzima secretada pelo epitélio prostático, presente tanto no sêmen quanto no sangue. Pode ser usada na avaliação de origem prostática de um carcinoma metastático.

Produtos de oncogenes e genes supressores tumorais - uma profusão destes marcadores está disponível no mercado, e muitos já são usados freqüentemente por laboratórios de imuno-histoquímica, usualmente em baterias prognósticas de neoplasias. Os mais conhecidos são o **p53** e o **c-erbB-2**, usualmente marcadores de mau prognóstico. O **bcl-2**, pertencente a uma categoria de genes reguladores da apoptose, pode também ser usado na diferenciação de proliferações linfóides foliculares neoplásicas versus reacionais.

Proteína básica de mielina (policlonal) - usada principalmente para definir diferenciação para bainha neural, carece de especificidade e sensibilidade.

Proteína S-100 (policlonal) - encontrada em uma grande variedade de células normais - melanócitos, subpopulações de histiócitos, condrócitos, adipócitos, músculo cardíaco e esquelético, células de Schwann, entre outras - pode também expressar-se nos tumores correspondentes. Duas de suas maiores utilidades são a positividade citoplasmática e nuclear, usualmente extensa, em virtualmente todos os melanomas, e na evidência de diferenciação para bainha de nervo periférico.

PSA, antígeno específico da próstata - É uma protease que lisa o coagulado seminal após a ejaculação. Marca o epitélio prostático normal e seus carcinomas. Dentre os marcadores órgão-específicos, é o que tem maior utilidade, pois não tem sido relatado em carcinomas de origem não prostática. Por outro lado, glândulas peri-uretrais masculinas normais podem ser positivas.

Receptor de estrógeno (1D5) - reage com o domínio N-terminal da proteína receptora de estrógeno, encontrada em maior concentração no núcleo de células epiteliais mamárias e endometriais. Usualmente utilizado em baterias prognósticas para carcinoma de mama. O clone 1D5, usado com recuperação de epítomos pelo calor, é consideravelmente superior aos anteriormente usados, como o H222 (que é usado com digestão enzimática).

Receptor de progesterona (1A6) - Usado nas baterias para carcinoma de mama. Os marcadores nucleares parecem sofrer mais com o excesso de fixação em formalina do que os citoplasmáticos, o que parece aplicar-se particularmente aos receptores hormonais.

Sinaptofisina (Snp88) - Proteína ligadora de cálcio que está presente nas vesículas pré-sinápticas dos neurônios e nos grânulos neurosecretórios das células neuroendócrinas. Alegado marcador de diferenciação neuroendócrina, nós temos considerável dificuldade no uso deste marcador, pois as reações são difíceis de interpretar, dada a sua intensidade freqüentemente tênue e coloração de fundo constante. Alguns autores comentam que reações de melhor qualidade podem ser obtidas em material fixado em Bouin ou B5. Infelizmente, pouco material da rotina pode aí ser incluído.

TAG-72 (B72.3) - antígeno associado ao carcinoma ovariano e coloretal. Reage com a grande maioria dos tumores ginecológicos, gastrointestinais, da próstata e sistema bileo-pancreático, mas apenas com um número pequeno dos tumores da tireóide e do rim. Hepatocarcinomas são negativos para este marcador. Também usado no painel de diferenciação carcinoma X mesotelioma, pois usualmente é negativo nos mesoteliomas.

Tireoglobulina (RBU/01; DAK-Tg6) - proteína sintetizada pela tireóide que provê sítios de iodonização para formação dos hormônios tireoidianos. Apresenta alta sensibilidade para os carcinomas primários e metastáticos da tireóide, sendo muito usado para o estudo de tumores papilares metastáticos. Importante reconhecer que os carcinomas papilares esclerosantes da tireóide são usualmente negativos.

Vimentina (V9; vim 3B4) - filamento intermediário típico das células mesenquimais, e portanto dos sarcomas. Muitos carcinomas também apresentam positividade para vimentina, principalmente os renais, endometriais, pulmonares e mamários. Sem o uso de recuperação de epítomos pelo calor, reações fracas para este marcador podem ser usadas como um marcador de excesso de permanência no formol. Quando a recuperação a quente é usada, no entanto, mesmo com tempos extremamente prolongados de fixação as reações se mantêm igualmente intensas.

IMPRESSO PELA GRÁFICA
MELHORAMENTOS COM FILMES
FORNECIDO PELO EDITOR