O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações

The use of immunohistochemistry: indications and limitations

MARINEZ BIZARRO BARRA – Professora Assistente do Departamento de Patologia da FFFCMPA. Médica responsável pelo Setor de Imunoistoquímica do Laboratório de Patologia da ISCMPA.

Hospital Santa Rita, ISCMPA. Laboratório de Patologia.

✉ Endereço para correspondência:
Marinez Bizarro Barra
Rua Sarmento Leite, 187.
Fone: (51) 3214-8410 – (51) 3214-8411
Fax: (51) 3214-8329
90050-187 – Porto Alegre, RS – Brasil
mbbarra@uol.com.br

RESUMO

A imunoistoquímica tornou-se um método auxiliar de diagnóstico de extrema importância e utilidade. A técnica da imunoistoquímica por envolver fatores variados (uma grande gama de anticorpos com origens variadas, utilizados sob condições não uniformemente estabelecidas e em uma variedade de situações), embora seja uma ferramenta de grande valor, ainda mostra áreas com problemas não solucionados. Neste artigo, de uma forma relativamente sucinta, abordamos vários desses aspectos, sabendo que pela amplitude do tema alguns aspectos não foram abordados.

UNITERMOS: Imunoistoquímica, Anticorpos, Diagnóstico de Neoplasias, Marcadores de Diferenciação Celular, Marcadores Prognósticos em Neoplasias.

ABSTRACT

The immunohistochemistry has become an invaluable auxiliary tool, with the utmost importance and utility. The technical aspects of immunohistochemistry with many variable factors (an extensive number of antibodies from different sources, most of the times utilized under variable and non uniform conditions), despite of being of the utmost relevance still shows areas with unsolved problems. In this article in a relative succinct way, we approach many of these aspects, knowing that some of them were not approached.

KEY WORDS: *Immunohistochemistry, Antibodies, Diagnosis of Neoplasms, Markers of Cellular Differentiation, Prognostic Markers.*

INTRODUÇÃO

Os exames imunoistoquímicos estão cada vez mais sendo utilizados na rotina diagnóstica (1, 2, 3). Esse crescimento no uso de arma diagnóstica tão poderosa pode ser evidenciado pelo crescente número de laboratórios de patologia que utilizam essa técnica em suas rotinas diagnósticas, bem como pelo sempre crescente volume de trabalho desses laboratórios com o passar dos anos (1). Isso se deve a alguns fatores:

a) a necessidade, cada vez mais presente, de diagnósticos precisos para determinar tratamento e prognóstico, principalmente de neoplasias;
b) um número crescente de anticorpos disponíveis para o uso em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina;
c) a disseminação da técnica, com vários avanços, um deles de fundamental importância, a assim chamada técnica de recuperação antigênica (sistemas de recuperação de epítopos através do calor – radiação ou calor úmido);
d) e principalmente a disseminação da idéia, não necessariamente correta, de que o exame imunoistoquímico resolverá todas as dúvidas diagnósticas.

Todo o exame imunoistoquímico, para garantir a sua qualidade e utilidade, deve ser baseado em certas premissas: correta indicação dos casos para o exame, num contexto clínico-morfológico adequado, sabendo-se de antemão as vantagens e os limites do método; a seleção dos anticorpos a serem utilizados, baseada sempre numa análise criteriosa dos aspectos clínico-morfológicos do caso em questão e com avaliação custo/benefício; protocolo padronizado de reações; interpretação dos resultados pelo médico patologista, a qual deve ter como base informações clínicas completas, dados de exames complementares e uma análise criteriosa dos aspectos morfológicos da lesão examinada. Talvez esta última, em nosso meio, seja um ponto crítico. O grande volume de pacientes dos nossos serviços de saúde e a terceirização dos exames imunoistoquímicos, faz com que muitas vezes as informações pertinentes ao caso não sejam recebidas (**idade; sexo; localização da lesão; tempo de evolução; sintomas e dados de exames complementares**), tornando a análise do caso incompleta, com o risco maior de diagnósticos incorretos. A terceirização de exames (exames enviados a um segundo laboratório para realização do exame imunoistoquímico por solicitação do clínico ou cirurgião) gera muitas vezes um segundo problema: a solicitação pelo colega do exame imunoistoquímico, muitas vezes sem informação sobre o resultado do histopatológico e sem a devida informação do propósito, ou seja, exame solicitado para: **confirmação do diagnóstico; elucidação de dúvida diagnóstica; subclassificação de uma neoplasia; fatores prognós-**

Recebido: 31/03/2006 – Aprovado: 10/04/2006

ticos em determinados tipos de tumores (ex.: carcinomas de mama).

Genericamente, podemos considerar como principais indicações do exame imunoistoquímico (1,2):

a) diagnóstico histogenético de neoplasias morfologicamente indiferenciadas;
b) caracterização de origem de carcinomas metastáticos;
c) subclassificação de neoplasia (ex.: linfomas);
d) identificação e caracterização de produtos de secreção de células neoplásicas;
e) discriminação da natureza benigna ou maligna de certas proliferações celulares;
f) avaliação prognóstica das neoplasias;
g) identificação de agentes infecciosos.

ASPECTOS TÉCNICOS

Em 2005, no "Nonagésimo Quarto Encontro Anual da Academia Americana e Canadense de Patologia (USCAP)", em San Antonio, Texas, o professor Allen M. Gown (Medical Director and Chief Pathologist of Pheno Path Laboratories, Seattle, Washington, and Clinical Professor of Pathology, University of British Columbia) no curso de "Diagnóstico Imunoistoquímico de Tumores Sólidos", faz referências a vários pontos fundamentais para diagnóstico imunoistoquímico (3). O professor Gown é reconhecido como um dos principais especialistas nas aplicações diagnósticas e na pesquisa da imunoistoquímica. Desenvolveu inúmeros anticorpos monoclonais importantes usados mundialmente (ex.: HMB-45, 34âE12, HHF35, OSCAR), tendo contribuído para a disseminação e expansão da imunoistoquímica. Em 2006 a descoberta do anticorpo HMB45, usado para o diagnóstico de melanomas, completa 20 anos (produzido por Gown e Vogel em 1986) (4). O professor Gown faz referência a cinco "leis de Gown" em relação à imunoistoquímica:

a) Primeira lei – Não existe marcador perfeito para os tumores.
b) Segunda lei – Não existe fixador (ex.: formol) perfeito para todos os anticorpos.
c) Terceira lei – Tudo que apresenta coloração marrom (cromógeno utilizado) não é necessariamente positivo.
   - Corolários: **se tudo é positivo, nada é positivo**; o uso de controles positivos é necessário; o uso de controles negativos para cada anticorpo é uma perda de tempo e material, não tendo validação científica; controles negativos para métodos imunoistoquímicos diversos devem ser empregados.
d) Quarta lei – Para todos os antígenos (a_1.... a_n) e tumores (t_1.... t_n), existe ou existirá uma publicação científica afirmando que o antígeno (a_1) é expresso no tumor (t_1).
e) Quinta lei – Na maioria dos estudos imunoistoquímicos que envolvem o uso de inúmeros anticorpos, o "tecido irá cair ou ser inutilizado no anticorpo mais crítico" ("Lei de Murphy").
f) Sexta lei – O peso diagnóstico de qualquer estudo imunoistoquímico não é maior que a sabedoria e prudência do patologista que o interpretará.
   - Corolário: **um tolo com uma ferramenta continua sendo um tolo.**

A sensibilidade e a especificidade quando falamos em procedimentos de imunoistoquímica têm aspectos próprios. A sensibilidade é a capacidade do teste em produzir o resultado desejado, e há dois componentes a serem avaliados: no anticorpo a identificação da percentagem de resultados positivos verdadeiros e no método o mínimo detectável de antígeno na lâmina. A especificidade (capacidade do teste em detectar positivos verdadeiros e não falsos negativos) é afetada por duas variáveis: fixação e processamento do tecido (estas muitas vezes fogem ao controle do patologista responsável pelo exame imunoistoquímico, no caso de terceirização do exame) e a metodologia usada (clone dos anticorpos e sistema de detecção). A fixação dos tecidos nos laboratórios de patologia não é uniformizada; dessa forma, os tecidos estão ou fixados em excesso ou pouco fixados. A fixação em excesso não traz problemas mais sérios para a realização da técnica de imunoistoquímica, já a fixação reduzida é extremamente deletéria para esse tipo de exame, pois teremos autólise tecidual, com perda da antigenicidade (falsos negativos). Um outro processo no preparo do tecido que interfere com alguns dos anticorpos utilizados é a descalcificação, e os efeitos relatados são variados, devendo-se evitar a descalcificação prolongada e o uso de ácidos muito fortes (3).

Os motivos para as divergências relatadas na literatura na sensibilidade e especificidade dos anticorpos estão relacionados a uma gama variada de fatores (2, 3):

1. emprego de anticorpos diversos (geralmente clones diferentes);
2. a não uniformidade dos sistemas de detecção (sistemas de amplificação de alto desempenho, tais como: avidina-biotina-peroxidase; estreptavidina-biotina-peroxidase; avidina marcada; sistemas baseados na detecção de polímeros);
3. métodos diversos de recuperação antigênica e de pré-tratamento do tecido (ex.: digestão enzimática);
4. diferentes definições de tumor;
5. diferentes definições de positividade (percentagem de células positivas; intensidade de positividade ou uma combinação de percentagem de positividade com intensidade da positividade – e.g. escore Allred).

Existem muitas fontes comerciais de anticorpos confiáveis, infelizmente a maioria delas situadas no exterior, e apenas muito poucas com representantes comerciais no Brasil. Dessa forma há um aumento dos custos do exame imunoistoquímico em nosso meio, bem como torna-se mais difícil à obtenção

de certos clones específicos. Um ponto importante a ser ressaltado é que não devemos comprar e usar um anticorpo baseados apenas na indicação do seu fabricante; devemos, sempre que possível, validar esse anticorpo (através da solicitação de alíquotas) em nosso laboratório (usando as nossas rotinas). Cada laboratório deve buscar o seu ponto ideal de titulação para cada anticorpo e não apenas seguir as indicações do fabricante (2, 3). Quanto a essas indicações, um outro ponto a ser citado são as datas de validade do anticorpo fornecidas pelo fabricante. Um anticorpo continua válido, mesmo após a expiração da data de validade comercial, se os controles utilizados mostrarem uma boa preservação da sua imunorreatividade (2).

A recuperação antigênica, de materiais fixados em formalina e processados com parafina (técnica mais utilizada na rotina histológica), obteve um avanço considerável quando, em 1991, Shi SR e colaboradores (5) desenvolveram o método de recuperação antigênica (epítopos) com o uso de calor (forno de microondas). Essa técnica é de grande utilidade na maioria dos anticorpos, pois melhora a positividade, reduz o efeito de "background" (redução da peroxidase endógena), permite uma titulação mais elevada e aumenta a sensibilidade dos anticorpos para células e proteínas-alvo. Como em toda a técnica usada existem fatores adversos, tais como: perda da integridade tecidual; aumento do sinal da biotina endógena; surgimento de falsos negativos ou de falsos positivos (2,3). As fontes de calor utilizadas para recuperação antigênica são as seguintes: forno de microondas; panela de cozimento a vapor; banho-maria; panela de pressão; autoclaves e forno convencional.

Os limiares de positividade para imunoistoquímica podem ser definidos como: negativo; positividade focal (1-25%); positividade variável (25% a 75%) e uniformemente positiva (mais de 75%). Uma reação positiva verdadeira mostra deposição do cromógeno em células ou estruturas que contêm o antígeno de interesse. Já em uma reação falso-positiva há deposição do cromógeno em estruturas que não deveriam conter o antígeno (células tumorais positivas e o estroma intercelular também). Alguns dos motivos para essa falsa positividade são: peroxidase endógena; biotina endógena (presente em concentrações altas no fígado e rim); concentração inadequada (alta) do anticorpo e identificação equivocada de pigmentos (melanina; hemossiderina) como positividade do anticorpo (3). Os anticorpos têm sua expressão em locais específicos da célula, tais como: citoplasma (citoqueratinas); núcleo e citoplasma (proteína S100); núcleo (receptor de estrógeno); membrana citoplasmática (CD20); membrana e Golgi (CD30); membrana com localização apical (vilina) e marcação extracelular (colágeno tipo IV). Essas diferenças relacionam-se aos aspectos da célula em questão: produção; transporte e adesão celular. Portanto, quando analisamos uma reação específica é imperativo ter conhecimento exato do que esperamos encontrar (3).

Pelo exposto acima, podemos concluir que a técnica da imunoistoquímica é uma "arte"; e como o professor Gown cita: "Os anticorpos têm personalidades próprias, necessitando ser manuseados individualmente" (3).

INDICAÇÕES DA IMUNOISTOQUÍMICA

Neoplasias indiferenciadas

Uma das principais indicações do exame imunoistoquímico é a tentativa de classificar histogeneticamente neoplasias com aspectos indiferenciados nas lâminas de rotina, sejam elas de grandes ou pequenas células (1-3). Essa tentativa se faz necessária para podermos aplicar esquemas radio ou quimioterápicos mais adequados. Esse tipo de lesão caracteristicamente envolve diagnósticos diferenciais entre carcinoma, linfoma, sarcoma e melanoma. Ou seja, há necessidade de uma abordagem ampla, com a utilização muitas vezes de um painel imunoistoquímico com mais de uma etapa. Nesse ponto é bom enfatizar que nenhum procedimento feito apressadamente tem um resultado ótimo e que em alguns casos, felizmente raros, não conseguiremos chegar a um resultado satisfatório para o paciente. Isso pode ser devido a fatores inerentes à própria neoplasia (ex.: em alguns tipos de sarcoma a associação de exame imunoistoquímico, análise molecular e microscopia eletrônica resultam no padrão ouro de diagnóstico), as condições do material ou mesmo as deficiências do laboratório (ex.: não dispor dos anticorpos necessários ao diagnóstico) (6). No caso das neoplasias malignas indiferenciadas de grandes células, a apresentação típica é em linfonodos, também ocorrendo como massa tumoral em partes moles. Uma abordagem inicial deveria sempre conter os seguintes anticorpos: citoqueratinas (AE1/AE3 ou OSCAR); vimentina (V9); antígeno do melanoma (HMB45 ou Melan A) e CD45 (PD7/2B11) (3). Uma positividade uniforme para citoqueratinas geralmente é um indicativo do diagnóstico de carcinoma. Nesse caso um segundo passo é necessário na tentativa de diagnóstico mais preciso: a identificação do sítio primário dessa neoplasia.

Metástases de carcinomas com sítios primários desconhecidos

Muito tem sido publicado a respeito de painéis imunoistoquímicos para identificação de metástases de carcinomas com sítio primário desconhecido. É necessário reafirmar que não existem anticorpos específicos para um tumor e que na maioria das vezes poderemos, com o uso de uma combinação de anticorpos, sob a forma de algoritmos, dar uma indicação dos sítios primários mais prováveis (2,3). A grande expectativa do clínico de que a realização do exame imunoistoquímico irá resolver de forma pontual essas questões é na maioria das vezes infundada. Devemos reafirmar que o exame imu-

noistoquímico por si só não faz diagnóstico, sendo necessária a realização de todos os outros exames complementares disponíveis. Triste, mas verdadeiro, é que mesmo usando todo o arsenal diagnóstico disponível, algumas vezes não encontraremos a resposta definitiva.

Em relação ao diagnóstico de carcinomas com sítio primário desconhecido, devemos usar uma abordagem multissegmentada, a partir do uso das citoqueratinas associadas a marcadores tumorais específicos e eventualmente com o uso de marcadores acessórios. Alguns dados resumidos sobre esses marcadores são explicitados a seguir:

a) Citoqueratinas 7 e 20: estas queratinas têm distribuição única nos tecidos normais, sendo essa distribuição refletida nas especificidades tumorais correspondentes. A citoqueratina 20 (Ks 20.8) expressa normalmente no epitélio colônico e no carcinoma colorretal. A citoqueratina 7 (OVTL 12/30) expressa em epitélio glandular, virtualmente expressa em todos os carcinomas da mama, carcinomas serosos do ovário, carcinomas de endométrio, pulmão e tireóide. Na expressão de ambas, os carcinomas do trato gastrointestinal e do trato geniturinário devem ser considerados e na ausência os carcinomas prostáticos, carcinomas hepatocelulares; carcinomas da cortical da supra-renal e carcinóides (7,8).
b) Citoqueratina 5/6 (D5/16B4): queratina expressa normalmente no epitélio escamoso; células basais-mioepiteliais da próstata, mama e glândulas salivares. Pode ser usada na identificação de carcinomas escamosos, carcinomas transicionais e mesoteliomas. Usada em combinação com as citoqueratinas 7 e 20 resulta numa maior subcategorização dos carcinomas (7,8).
c) Citoqueratinas de alto peso molecular (34bE12) e citoqueratinas de baixo peso molecular (35bH11) também podem ser usadas na identificação de sítios primários. Os carcinomas da mama, pancreático, ovariano, adenocarcinoma de pulmão e o carcinoma de células transicionais expressam comumente ambas. Os hepatocarcinomas; carcinomas de células renais, endometriais, colônicos e as neoplasias neuroendócrinas com expressão das citoqueratinas de baixo peso molecular. O carcinoma de células escamosas tem como característica expressar a citoqueratina de alto peso molecular (8).
d) Marcadores tumorais específicos podem ser de duas categorias: marcadores de diferenciação citoplasmáticos (ou de membrana) ou fatores de transcrição nuclear. Os marcadores citoplasmáticos ou de membranas são proteínas de células com diferenciação terminal, cuja expressão é inversamente proporcional ao grau de diferenciação e com uma expressão que pode estar presente numa pequena parte da população celular tumoral (sendo necessária a avaliação cuidadosa da representatividade da amostra tumoral com o risco de o resultado ser diferente em amostras diversas). Esse tipo de marcadores são bem representados pelos: antígeno prostático-específico (PSA) (3,10); fosfatase ácida prostática (PAP); tireoglobulina; GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein-15) com uma sensibilidade para tumores de mama em torno dos 70%, essa expressão independe do grau de diferenciação tumoral, índice mitótico ou *status* de receptores hormonais (estrogênio) (2,3,17); HepPar1 (OCH1E5), anticorpo monoclonal específico para hepatócitos; apoproteína A do surfactante; tireoglobulina e vilina (proteína expressa em microvilosidades com uma alta sensibilidade para carcinomas colorretais, gástricos e pancreáticos). Os marcadores provenientes de fatores de transcrição nuclear são proteínas com uma estrutura modular única, composta de ligações com o DNA e com domínios de regulação (ativação) da transcrição. São geralmente positivos em toda a população celular tumoral, a sua expressão não está necessariamente relacionada ao grau de diferenciação celular, sendo dessa forma altamente sensíveis e específicos. Os principais marcadores disponíveis dessa categoria são: TTF1 (fator de transcrição da tireóide 1), com alta sensibilidade para carcinomas da tireóide e uma especificidade maior para carcinomas do pulmão, neuroendócrinos ou não (no tecido pulmonar há ligação com promotores de ativação de proteínas do surfactante e de proteínas das células Clara)(2,3); o CDX2 é um fator de transcrição nuclear intestinal, regulando a proliferação e diferenciação das células intestinais, sendo um marcador com alta sensibilidade para carcinomas colorretais, com uma excelente utilização para diferenciar metástases pulmonares de carcinomas colorretais de adenocarcinomas primários do pulmão (9). O marcador nuclear conhecido como WT-1 (originado do gene supressor tumoral do tumor de Wilms, localizado no cromossomo 11p13), é uma proteína com ligação ao DNA com papel crítico no desenvolvimento do trato geniturinário, expressa em vários tecidos maduros (células do mesângio; células de Sertoli; células do estroma e do epitélio superficial ovariano e mesotélio). Atualmente é considerado um marcador com alta sensibilidade e especificidade para carcinomas serosos de ovário e mesoteliomas peritoneais (2).
e) Outros marcadores tumorais que podem ser usados nos casos de carcinomas com sítio primário desconhecido incluem: a família dos antígenos carcinoembriônicos (CEA), com grande uso como marcador sorológico de carcinomas de cólon, porém com expressão em epítopos diferentes em diversos tipos de epitélio; receptores de estrogênio ou de progesterona (RE/RP); o anticorpo CA-125, derivado de um com-

ponente glicoproteináceo de células de carcinoma ovariano, também expresso em células mesoteliais e em neoplasia do trato mülleriano; o anticorpo CA19-9, obtido de uma cultura de células de carcinoma colônico humano, com expressão em carcinomas gastrintestinais, pancreáticos, de vias biliares, bexiga, ovários e endométrio (negativo em carcinomas renais e hepatocelulares); a fosfatase alcalina placentar (PLAP) universalmente presente em tumores de células germinativas, os quais muitas vezes não apresentam marcação para citoqueratinas ou mesmo pelo antígeno da membrana epitelial (EMA) (2).

Na situação de metástases, ou mesmo de neoplasias primárias, com características histológicas sugestivas de uma diferenciação neuroendócrina, podemos confirmar essa diferenciação através de marcadores comumente utilizados, como a cromogranina A, sinaptofisina, enolase neurônio-específica; CD56; e também com citoqueratinas, como a citoqueratina 8/18, que no caso de neoplasias neuroendócrinas mostra um padrão citoplasmático puntiforme (granular) característico. Não é aplicável o exame imunoistoquímico nesses tumores para definição de sítio primário, já que a maioria deles têm expressões superponíveis de marcadores (2).

Subtipagem de neoplasias

A expressão de antígenos relacionados à linhagem celular é fundamental para a imunofenotipagem das neoplasias hematopoiéticas, e com essa subclassificação um tratamento adequado poderá ser oferecido ao paciente. Podemos afirmar que a diferenciação histogenética das neoplasias hematopoiéticas grosseiramente segue o mesmo caminho de diferenciação das células correspondentes sadias. Exemplificando nas neoplasias derivadas de células B, espera-se que antígenos como o CD20 ou o CD79a sejam expressos. Contudo, a diferenciação (maturação) de uma neoplasia hematopoiética pode parar em qualquer estágio e a expressão de antígenos específicos da linhagem celular varia, dependendo do grau de maturação da neoplasia. Além disso, algumas dessas neoplasias podem perder um ou vários antígenos e outras podem apresentar expressão aberrante (anômala) de antígenos de linhagens diversas. Além disso, os estudos moleculares demonstram que a maioria das neoplasias hematológicas tem uma ou mais alterações genéticas, as quais muitas vezes resultam em expressão aumentada de uma proteína. Dessa forma, a imunofenotipagem das neoplasias hematopoiéticas é bastante complexa e está em constante mudança devido à descoberta de novos reagentes, metodologias e principalmente avanços extraordinários na biologia molecular dessas neoplasias. Apesar disso, podemos afirmar que a maioria dos casos mostra um defeito molecular constante e consistente, expressando um grupo de antígenos da mesma forma constante e consistente (2,3,12-16). Dentre os antígenos e correspondentes anticorpos comumente expressos e utilizados para a imunofenotipagem histoquímica das neoplasias hematopoiéticas, os mais freqüentemente utilizados são:

a) CD45 (antígeno comum leucocitário) – é formado por um grupo de anticorpos que identifica uma glicoproteína transmembrana que é expressa em virtualmente todas as células hematolinfóides e seus precursores. A sua sensibilidade para linfomas de baixo grau é alta, caindo nas neoplasias de alto grau. Existem subgrupos deste antígeno como CD45RA, CD45RB e CD45RO, com expressão mais restrita a certas linhagens celulares, porém sem uma especificidade marcada (ex.: CD45RO marca cerca de 78% dos linfomas de células T, marcando também cerca de 4% dos linfomas de células B).
b) CD20 (clone geralmente utilizado é o L26) – identifica uma fosfoproteína embebida na membrana celular que está restrita aos antígenos presentes nas células B. É expresso em células B maduras e pré-maduras, sendo perdido antes da diferenciação terminal das células B em plasmócitos. O CD20 é expresso em cerca de 95% dos linfomas de células B, com um padrão de membrana, com exceção dos linfomas linfoblásticos de células B.
c) CD79a (clone geralmente utilizado HM57) – identifica uma proteína que é parte do receptor das células B associada com a expressão de uma imunoglobulina de superfície. É encontrado em vários estágios da maturação das células B, das mais imaturas até a diferenciação em plasmócitos. O padrão de marcação é citoplasmático, sendo que este anticorpo reconhece virtualmente todas as neoplasias de células B, com exceção dos plasmocitomas, onde até 50% podem ser negativos.
d) CD23 – é expresso na membrana celular de células B e num subgrupo de células B ativadas. É um marcador de leucemia linfocítica crônica de células B / linfoma linfocítico de pequenas células (LLC/LL).
e) CD10 – é uma metaloendopeptidase da superfície celular conhecida como antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA). É expresso num pequeno número de células da medula óssea, células fetais do fígado e é fracamente expresso por granulócitos maduros. Foi identificado na superfície de células B imaturas na medula óssea de adultos e em células B dos centros germinativos de linfonodos. Não é expressa em células interfoliculares, B ou T, de linfonodos normais. É expresso em cerca de 90% das leucemias linfoblásticas (maior expressão nas de linhagem B), linfoma de Burkitt, linfoma difuso de grandes células B e em cerca de 30% dos mielomas múltiplos. Vários tecidos e neoplasias de outras linhagens também expressam CD10: células mioepiteliais da

mama; canalículos biliares; carcinoma de células renais (células claras) e sarcoma do estroma endometrial.

f) CD3 – grupo de anticorpos que reconhece uma proteína associada com receptores de células T presentes na membrana de células T maduras. As células T imaturas são negativas para CD3 com expressão em membrana, mas freqüentemente positivas para expressão citoplasmática usando-se anticorpos policlonais, sendo bastante específico para linfomas blásticos de células T. O CD3 é expresso em cerca de 80% dos linfomas de células T.

g) CD4 – antígeno expresso em células T auxiliares; monócitos; macrófagos, células de Langerhans e outras células dendríticas. Não é expresso em células B. O CD4 está presente na maioria dos linfomas de células T periféricos; micose fungóide e na leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao vírus HTLV-1.

h) CD5 – antígeno presente em 95% dos timócitos e na maioria das células T imaturas periféricas. Os linfomas T periféricos e os linfomas cutâneos têm uma perda aberrante do CD 5 em até 40% dos casos. Esse anticorpo apresenta coexpressão e em certas neoplasias de células B, caracteristicamente a LLC/LL. O CD5 é utilizado também no diagnóstico dos carcinomas tímicos onde há expressão conjunta com citoqueratina.

i) CD7 – glicoproteína ligada à membrana, expressa precocemente em linfócitos T imaturos. Sua expressão é comumente perdida em neoplasias de células T, com exceção dos casos de leucemia linfoblástica de células T. Um subgrupo de leucemias mielóides e a maioria das neoplasias de células NK (natural-killer) também expressam esse antígeno.

j) CD8 – presente em células com atividade citotóxica (antígenos ligados à membrana associados ao MHC – moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I). Estas incluem células T citotóxicas/supressoras e um subgrupo de células NK. São encontradas em: linfoma de células T paniculite-like com fenótipo alfa/beta; raros casos de micose fungóide clássica, mas com um fenótipo $CD4^-$ e $CD8^+$, síndrome de Sezary; linfoma agressivo primário epidermotrópico $CD8^+$.

k) CD56 (NCAM) – antígeno expresso em neurônios, astrócitos e células de Schwann e um subgrupo de linfócitos com funções NK e um subgrupo de linfócitos T ativados. Está presente em alguns tipos de linfomas periféricos de células T, linfomas nasais T/NK e alguns grupos de leucemias mielóides agudas. É necessário ressaltar que as neoplasias classificadas anteriormente como leucemias/linfomas linfoblásticos de células NK, com um fenótipo $CD4^+$ e $CD56^+$, são derivadas das recentemente descritas células plasmocitóides dendríticas. Estas células produzem interferon, TLR-7 e TLR-9 (receptores "toll") e promovem a função de células B, T, NK e de células dendríticas.

l) CD15– antígeno associado aos granulócitos (neutrófilos maduros e monócitos) e um subgrupo de células T. Os clones mais utilizados são o Leu-M1; C3D1 e BG-7. A expressão pode ser de membrana, citoplasmática, paranuclear (Golgi) ou uma combinação destas. Nos linfomas, o linfoma de Hodgkin clássico mostra uma expressão desse marcador em até 75% dos casos, contrastando com a marcação quase inexistente no linfoma de Hodgkin, forma nodular, predomínio linfocítico. O CD15 é expresso numa variedade de neoplasias linfóides ou não (linfomas T e B, linfomas de células anaplásicas e carcinomas, particularmente adenocarcinomas).

m) CD30 – os grupos de anticorpos (Ki-1 e BerH2) reconhecem uma proteína associada à ativação, membro da família do fator de necrose tumoral/superfamília do fator de crescimento neural. A expressão de CD30 pode ser de membrana, paranuclear (Golgi) ou ambas. A positividade citoplasmática difusa sem membrana ou positividade paranuclear (Golgi) não deve ser considerada. O CD30 é positivo nas células de Reed-Sternberg em cerca de 90% dos linfomas de Hodgkin clássicos. É positivo em quase todos os linfomas anaplásicos de grandes células e mostra positividade no carcinoma embrionário (tumor germinativo).

n) CD138 – o anticorpo reconhece uma proteína conhecida com Sydecan-1, que funciona como receptor para colágeno e fibronectina. O anticorpo CD138 é expresso em células plasmáticas normais e neoplásicas, sendo útil na identificação dos plasmocitomas e gamopatias monoclonais.

o) Ciclina D1– Proteína nuclear (PRAD 1) reguladora do ciclo celular (surge na metade de G_1, não sendo mais detectável na fase S do ciclo celular). A expressão nuclear da ciclina D1 é altamente sensível e específica para o linfoma de células do manto, devido à translocação t (11,14) lócus do gene da ciclina, sendo um marcador indispensável para esse diagnóstico. Por estar relacionado ao ciclo celular, há variação na marcação na área tumoral examinada.

p) Bcl-2 – proteína da membrana mitocondrial, produto do oncogene Bcl-2, responsável pela diminuição da morte celular e pela prevenção da morte celular programada (apoptose). A proteína Bcl-2 está presente numa gama variada de tecidos hematolinfóides ou não. Embora a coloração pareça ser de membrana, ela é citoplasmática. A expressão de Bcl-2 é geralmente negativa em centros germinativos reacionais, porém positiva nos folículos neoplásicos do linfoma folicular. Também se mostra positiva em linfomas de células B de baixo grau; linfomas da zona marginal; linfomas difusos de grandes células B, sendo negativa em linfoma de Burkitt.

Tem utilidade primordial na diferenciação dos processos foliculares reativos de processos neoplásicos, bem como diferenciar proliferações reacionais de células monocitóides B dos linfomas de células B monocitóides. Expressa-se também numa variedade de outras neoplasias, tais como: carcinomas pouco diferenciados da tireóide; tumor fibroso solitário; tumor maligno da bainha de nervo periférico.

q) Bcl-6 – protooncogene localizado no cromossomo 3q27, expresso principalmente em centros germinativos normais. A proteína Bcl-6 mostra um padrão nuclear e granular ao exame imunoistoquímico. Não há correlação direta entre a expressão de Bcl-6 e o rearranjo do gene Bcl-6. A expressão é variável nos linfomas difusos de grandes células B, linfomas foliculares e linfomas da zona marginal. Há expressão marcada e difusa nos casos de linfoma de Hodgkin forma nodular, predomínio linfocítico, sendo esta rara nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

r) ALK (quinase do linfoma anaplásico) – proteína com superexpressão na vigência da translocação t(2;5)q(p23;q35), a translocação mais freqüentemente associada com o linfoma anaplásico de grandes células. Os linfomas anaplásicos de grandes células tem melhor prognóstico quando a expressão de ALK está presente, sendo que a grande maioria dos casos ALK^+ expressam também o antígeno da membrana epitelial (EMA) e o CD30.

s) Cadeias leves de imunoglobulinas (Kappa e Lambda) – úteis para demonstrar a restrição de uma das cadeias (geralmente uma desproporção maior que 1:10 no número de células positivas para uma das cadeias leves). Este achado é indicativo de proliferação monoclonal, com o favorecimento do diagnóstico de neoplasia (ex.: plasmocitoma).

Do acima exposto, tem-se uma idéia da complexidade em imunofenotipar linfomas (atualmente existem só na categoria CD – *cluster differentiation* – mais de 250 antígenos descritos, muitos com anticorpos disponíveis). Além disso, muitos linfomas apresentam fenotipagens variadas devido a translocações diversas, necessitando o uso associado para um diagnóstico preciso de técnicas de avaliação molecular (PCR ou FISH) (12-16).

Um outro grupo de neoplasias que pode se beneficiar da subcategorização, embora esta muitas vezes seja difícil e mesmo com o uso de técnicas ancilares, como estudos moleculares e microscopia eletrônica, não seja totalmente possível, são as neoplasias de partes moles, principalmente os sarcomas. O tumores de partes moles freqüentemente mostram superposição de marcadores tidos como específicos de uma linhagem celular, bem como instabilidade genética e heterogeneidade da população celular (2, 3). Essa superposição de marcadores freqüentemente resulta em painéis de anticorpos muito extensos e de custo elevado. Muitas vezes devido à complexidade inerente às lesões de partes moles, o painel solicitado é inadequado devido à interpretação errônea dos achados histológicos. Nesses casos os resultados imunoistoquímicos podem ser internamente corretos (positividades ou negatividades), mas a interpretação não é adequada à presente lesão. Esses aspectos precisam ser considerados quando se tenta obter um diagnóstico mais elaborado das neoplasias de partes moles, sendo que os achados necessitam ser interpretados dentro de um contexto mais global, que inclui aspectos clínicos, macroscópicos, histologia, imunoistoquímica, técnicas moleculares e até a microscopia eletrônica (3, 17-19).

Dentre os anticorpos usados no diagnóstico das neoplasias mesenquimais, podemos citar como marcadores gerais:

a) Vimentina (V9, vim 3B4) – filamento intermediário presente em células mesenquimais e não-mesenquimais, portanto sem especificidade na determinação histogenética de tumores.

b) Desmina (DE-R-11; D33) – filamento intermediário presente em células musculares lisas, juntamente com a actina. Não é sensível nem específica, como se imaginava no início do seu uso, para tumores derivados de células musculares lisas (leiomiossarcomas). Os estudos mostram uma maior positividade, sem especificidade, deste marcador nos tumores derivados de células musculares estriadas (rabdomiossarcomas).

c) Actina muscular (HHF35) – reage com as isoformas de actina presentes em músculo estriado, cardíaco ou liso, sendo usada amplamente para a demonstração do fenótipo miogênico. Apresenta também expressão nas células mioepiteliais e miofibroblásticas, tendo, portanto, uma especificidade bastante limitada para as neoplasias derivadas de células musculares lisas.

d) Actina de músculo liso (1A4) – anticorpo com reação para a fração alfa dos microfilamentos da actina de músculo liso. Exibe um padrão de maior sensibilidade e especificidade para neoplasias derivadas de células musculares lisas, porém também pode apresentar expressão em rabdomiossarcomas e em células com diferenciação mioepitelial.

e) MyoD1 (5.A) e Miogenina (F5D) – proteínas reguladoras miogênicas, com papel na indução de células mesenquimais para a linhagem de células musculares estriadas. Estes marcadores tem alta sensibilidade e especificidade para rabdomiossarcomas e devem fazer parte do painel imunoistoquímico de casos suspeitos (2).

f) Fator VIII – foi um marcador extensamente utilizado para o diagnóstico de neoplasias originadas do endotélio vascular, porém, apesar da sua alta especificidade, apresenta uma sensibilidade muito baixa na identificação dos angiossarcomas, principalmente as formas mais indiferenciadas.

g) CD31(JC/70A) e CD34 (QBEnd/10) – são glicoproteínas, sendo o CD 31 expresso em plaquetas e granulócitos, e o CD34 expresso em células hematopoiéticas precursoras e em células endoteliais. O CD31 apresenta uma boa sensibilidade para o diagnóstico de angiossarcomas e sarcoma de Kaposi, bem como para neoplasias vasculares com padrão epitelióide. O CD34 expresso em células endoteliais é também expresso em células hematopoiéticas precursoras na medula óssea e em células fusiformes dendríticas fibroblásticas, com presença difusa no tecido conjuntivo. Há expressão do CD34 em leucemias, tumores vasculares e sarcoma de Kaposi. Em certas neoplasias, tais como o tumor fibroso solitário (18), tumor do estroma gastrointestinal e o sarcoma epitelióide, está freqüentemente presente, sendo utilizado com outros marcadores para o diagnóstico dessas lesões. Devido à natureza peculiar dessas lesões, levando-se em conta ainda que o CD34 não seja comumente expresso em carcinomas, melanomas e em uma variedade de condições benignas e reativas, tem-se obtido sucesso no diagnóstico desses tumores.

h) Proteína S-100 – expressa numa extensa variedade de células normais (melanócitos; condrócitos; histiócitos; células miocárdicas, musculares esqueléticas e células de Schwann), podendo também expressar-se nos tumores correspondentes, com uma expressão citoplasmática e nuclear que é marcada em grande parte dos melanomas e nos tumores de nervos periféricos benignos. Nos tumores malignos de bainha de nervo periférico (MPNST), essa expressão está diminuída. Nesses casos, somente 50-70% expressam S100 nuclear focalmente. O diagnóstico correto é alcançado com a utilização da microscopia eletrônica (presença de processo interdigitantes e de mesaxônios).

i) Bcl-2 – Está expressa numa variedade de neoplasias de partes moles, porém os seus usos mais apropriados são: a identificação da variante monofásica do sarcoma sinovial; o uso no diagnóstico de tumor fibroso solitário e do tumor do estroma gastrointestinal. O Bcl-2 está presente em 75% dos sarcomas sinoviais bifásicos com uma expressão de membrana marcada e homogênea. Essa positividade cai para 30% nos tumores fibrosos solitários (18).

j) CD99 (12E7, O13 e HBA-71) – reconhecem produtos do gene MIC2, uma glicoproteína da superfície celular. Apresentada em seu início como um marcador específico para os tumores PNET/Sarcoma de Ewing, observou-se com o uso a expressão em diversos tipos de tumores, principalmente aqueles denominados tumores de células pequenas, redondas e azuis (linfoma linfoblástico; rabdomiossarcoma; osteossarcoma de pequenas células; carcinoma neuroendócrino de pequenas células e tumor desmoplásico de células redondas). Também tem sido relatada sua expressão em neoplasias fusocelulares do tecido conjuntivo (condrossarcoma mesenquimal, sarcoma sinovial, leiomiossarcoma e o tumor fibroso solitário). O exposto indica a necessidade de prudência na utilização desse anticorpo (2, 3).

k) CD117, c-kit (104D2) – o protooncogene c-kit está localizado no cromossomo humano 4, relacionado ao receptor transmembrana tipo III da tirosina-quinase. Estruturalmente semelhante ao fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), pertence à família dos genes das imunoglobulinas e, juntamente com as integrinas, selectinas e caderinas, faz parte do grupo de moléculas de adesão célula-célula ou célula-estroma. Está presente num amplo espectro de tecidos normais (células-tronco da medula hematopoiética, mastócitos, epitélio mamário e de glândulas sudoríparas, células gliais; células basais da epiderme, células gliais e células intersticiais de Cajal) e numa variedade de neoplasias (leucemia mielóide aguda, melanoma maligno, carcinomas da mama, pulmão endométrio, ovário e tireóide). A importância do c-kit nas neoplasias de partes moles está relacionada à sua expressão nas neoplasias derivadas das células intersticiais de Cajal, os assim chamados tumores do estroma gastrointestinal (GISTs) (21-23). Aproximadamente 95% dos GISTs são positivos para o c-kit, sendo esta positividade geralmente difusa e forte, e com um padrão de distribuição citoplasmático, de membrana ou paranuclear granular. Aproximadamente 5% dos GISTs são negativos para o c-kit devido às mutações do gene PDGFRA (cadeia alfa do fator de crescimento derivado da plaquetas).

Novos anticorpos têm sido descobertos, por exemplo o MDM2 e CDK44, que estão presentes no tumor lipomatoso atípico/lipossarcoma, bem diferenciado. Este tumor contém cromossomos supranumerários gigantes ou em anel, com alterações 12q13-15, que contém genes amplificados MDM2 e CDK44. Essa amplificação resulta numa superexpressão de proteínas detectadas pela imunoistoquímica.

Nos tumores do sistema nervoso central, a imunoistoquímica tem um papel relevante, com uma grande variedade de anticorpos utilizados (1,2). Destacaremos alguns que são utilizados rotineiramente como ferramenta auxiliar de diagnóstico:

a) GFAP (proteína fibrilar glial ácida) – é um filamento intermediário das proteínas do citoesqueleto, sendo um dos componentes principais dos astrócitos, e portanto de utilidade primordial na avaliação da diferenciação astrocitária dos tumores. Nos astrocitomas gemistocíticos, a expressão é comumente citoplasmática, sendo que nos astrocitomas pilocíticos e fibrilares os processos celulares estão envolvidos. Nos tumores mais indiferenciados (glio-

blastoma) há uma diminuição da expressão, provavelmente relacionada com a perda de algumas das características da célula astrocítica. A GFAP não é específica dos astrocitomas, podendo mostrar-se positiva nos ependimomas; tumores mistos do tipo oligoastrocitomas; oligodendrogliomas (neste caso a expressão é restrita a inclusões intracelulares em células descritas como minigemistócitos). Os tumores primitivos neuroectodérmicos, centrais (PNET) e o meduloblastoma podem apresentar uma expressão de GFAP bastante variável em sua intensidade e geralmente restrita a algumas áreas do tumor.

b) Sinaptofisina (SY38) – anticorpo bastante confiável para a diferenciação neuronal quando positivo, levando-se em consideração que a sua não-expressão não afasta a diferenciação neuronal. A sinaptofisina apresenta padrões distintos de expressão em neurônios normais e neoplásicos, estando também presente em células ganglionares. Nos neurocitomas centrais (tumor de pequenas células localizado no terceiro ventrículo de jovens e adultos), o emprego da sinaptofisina (positiva nestes tumores) é de fundamental importância no diagnóstico diferencial com oligodendrogliomas.
c) NFP (proteínas do neurofilamento) – proteínas dos filamentos de peso molecular intermediário existentes em três isoformas e pesos moleculares (fosforilados e não fosforilados). O grau de expressão de cada um destes isotipos está relacionado ao grau de maturação neuronal. Esses aspectos, principalmente a fosforilação, são alterados pela fixação do material. Portanto, a expressão de NFP pode ser bastante delicada no exame imunoistoquímico, sendo útil usar mais de uma marcador neuronal.
d) EMA (antígeno da membrana epitelial) – proteína glicosilada de peso molecular intermediário. No SNC está caracteristicamente expressa em meningeomas, cordomas e carcinomas metastáticos.

Não existe dúvidas de que a imunoistoquímica é de grade valia no diagnóstico dos tumores do sistema nervoso central, ajudando a estabelecer novas entidades e reclassificando as neoplasias. Há uma contínua busca por estabelecer marcadores mais específicos, que poderão auxiliar no diagnóstico de certas linhagens celulares ainda não bem definidas.

Caracterização de produtos de secreção das células neoplásicas

O "sistema neuroendócrino difuso" é um assunto que desperta interesse na comunidade científica há muitas décadas. Muitas classificações foram utilizadas e muita controvérsia foi criada sobre o assunto. Na duas últimas décadas, dois grupos dos assim chamados tumores neuroendócrinos puros foram identificados: aqueles de linhagem epitelial (carcinomas grau 1, 2 e 3) e aqueles que demonstram características neurais (neuroblastoma; feocromocitoma; paraganglioma; meduloblastoma; retinoblastoma). Também tem sido notado que várias neoplasias muito indiferenciadas mostram diferenciação neuroendócrina "oculta". Neste artigo, focaremos nossa explanação nos tumores de linhagem epitelial. Estas neoplasias estão presentes nos mais vários sítios do corpo humano e, do ponto de vista de classificação, apresentam ainda algumas controvérsias. Sabemos hoje que os tumores chamados de tumores carcinóides típicos ou atípicos são os representantes dos carcinomas neuroendócrinos bem e moderadamente diferenciados. Devido ao uso consagrado do termo *carcinóide*, e devido ao comportamento desses tumores variar com a sua localização (os carcinóides de apêndice raramente metastatizam), a OMS ainda mantém para alguns destes tumores o termo *carcinóide*, porém se nos remetermos ao texto, veremos que estes tumores são essencialmente carcinomas bem diferenciados e como tal devem ser avaliados (2, 24).

Os marcadores de diferenciação neuroendócrina em neoplasias epiteliais apresentam um número considerável; aqui faremos referência apenas àqueles com uso difundido e bem avaliado (2, 24).

a) Cam 5.2 e citoqueratina 8/18 (5D3) – nestas neoplasias a positividade desta citoqueratina é distinta com um padrão granular, muitas vezes perinuclear.
b) Cromograninas A e B – são proteínas da matriz celular associadas a grânulos neuroendócrinos. Somente a cromogranina A (DAKA3) é disponível como anticorpo, portanto uma negatividade para cromogranina A não exclui a possibilidade de neoplasia neuroendócrina, principalmente naqueles tumores menos diferenciados.
c) Sinaptofisina (SY38) – proteína associada às sinaptovesículas dos neurônios e de células com diferenciação neuroendócrina ou neuroectodérmica. O anticorpo monoclonal tem sido usado com sucesso como marcador de diferenciação neuroendócrina, com uma expressão citoplasmática e granular.
d) CD56 e CD57 – estes dois marcadores têm o seu uso bem descrito na literatura como marcadores de diferenciação neuroendócrina. O CD56 (NCAM – molécula de adesão de células neurais) mostrou em vários estudos ser um marcador sensível para tumores neuroendócrinos, em especial o carcinoma de pequenas células do pulmão e de outros sítios (2). Devemos considerar em relação ao CD 56 que ele não é absolutamente específico para diferenciação neuroendócrina, podendo expressar-se em outras situações (carcinoma de células renais, carcinomas serosos do ovário). O CD57 parece ligar-se a componentes da matriz dos grânulos neuroendócrinos, corroborando e ampliando a marcação encontrada com o uso da cromogranina A.

e) Enolase neurônio específica (NSE) – este marcador apesar do seu nome, não mostra a especificidade desejada, e sua expressão aparece numa gama variada de neoplasias. Atualmente o uso da NSE está restrito a uma avaliação inicial das lesões, seguida da utilização de marcadores mais específicos.

Alguns tumores possuem expressão hormonal própria, o que é usado para diagnosticá-los ou subclassificá-los através de estudos imunoistoquímicos (24).

a) Adenomas hipofisários – nestes tumores, um painel para a pesquisa da expressão hormonal deve ser utilizado contendo os seguintes anticorpos: hormônio do crescimento, somatotrofina (GH); hormônio adrenocorticotrópico (ACTH); hormônio luteinizante (LH); hormônio folículo-estimulante (FSH); hormônio tireoestimulante (TSH) e prolactina (PRL). Podemos ainda incluir a cromogranina A para marcação da expressão neuroendócrina.
b) Tumores de células C da tireóide (carcinomas medulares) – estes tumores expressam calcitonina, podendo esta ser avaliada através do exame imunoistoquímico. Como cerca de 30% dos carcinomas medulares da tireóide são negativos para calcitonina, a utilização de outros marcadores faz-se necessária, sendo eles: cromogranina, sinaptofisina e o antígeno carcinoembriônico. Estas neoplasias não expressam marcação para tireoglobulina.
c) Pâncreas endócrino – as neoplasias das ilhotas pancreáticas perfazem uma pequena fração dos tumores pancreáticos. Os mais comuns são os insulinomas, que expressam marcadores neuroendócrinos mais gerais, como a cromogranina, expressando insulina e outros marcadores (glucagon, gastrina e somatostatina). Podemos ainda encontrar os chamados glucagonomas (tumores de células alfa), os gastrinomas (expressão de gastrina), os VIPomas (expressão do polipeptídio intestinal vasoativo) e tumores de células sigma (somatostatinomas).
d) Supra-renal – Os tumores da supra-renal podem ser localizados na cortical ou medular da glândula e a partir dessa localização apresentarem expressões hormonais diversas (as células corticais produzem glicocorticóides; mineralocorticóides e esteróides sexuais, já as células da medular estão relacionadas com a produção de catecolaminas). Na cortical os tumores podem expressar hormônio adrenocorticotrópico; aldosterona e mais raramente há produção de androgênio. O tumor característico da medular da supra-renal é o feocromocitoma, com a expressão característica dos marcadores neuroendócrinos mais gerais.

Avaliação prognóstica das neoplasias

Talvez em nenhum outro tipo de neoplasia este tipo de estudo imunoistoquímico tenha sido tão amplamente abordado, avaliado e criticado, como no carcinoma da mama, onde é atualmente rotina a avaliação de fatores prognósticos (1, 3). Nestes tumores alguns marcadores são específicos e outros como o p53 e o Ki-67 também são utilizados em outros tipos de tumores para avaliação prognóstica (especialmente o Ki-67 em linfomas e alguns tipos de sarcomas).

a) Receptores de estrógeno e progesterona – os receptores hormonais (RE e RP) são proteínas nucleares responsáveis pela mediação dos efeitos do estrógeno e da progesterona no epitélio mamário. São excelentes marcadores de diferenciação tumoral quando positivos (isto é avaliado por extensão e intensidade de coloração, com a utilização de métodos de escore) e são preditivos da resposta terapêutica. Tumores negativos para estes receptores tendem a ser mais agressivos e conseqüentemente com uma pior resposta à terapia.
b) Ki-67 (MIB-1) – antígeno de proliferação nuclear, cujo anticorpo correspondente está expresso nas células em proliferação, durante as fases ativas do ciclo celular, tendo relação direta com a fração de crescimento da população celular. Existe correlação deste marcador com vários fatores adversos, tais como tamanho do tumor, grau histológico e ausência de expressão dos receptores hormonais.
c) Oncogene c-erbB2 – é um proto-oncogene localizado no cromossomo 17, codificando uma proteína receptora transmembrana. A sua expressão está relacionada à agressividade biológica, denotando, quando presente, uma agressividade de maior do tumor. A utilização na imunoistoquímica do c-erbB2 com a demonstração de sua presença por uma expressão de membrana, que pode ser semiquantificada, está diretamente relacionada com a real amplificação do gene, verificada por técnicas de biologia molecular.
d) p53 – é uma fosfoproteína nuclear que regula a transcrição do DNA, a proliferação celular e a apoptose celular. A inativação do p53 (mecanismo de mutação ou deleção) representa uma das anormalidades genéticas mais freqüentes nas neoplasias humanas. O efeito regulador negativo do p53 sobre a proliferação celular parece ser inativado pelas mutações. Nessas mutações acontece acúmulo de proteínas alteradas, que podem ser detectadas pela imunoistoquímica. Na maior parte dos trabalhos publicados há correlação entre a expressão de p53 e o grau histológico, índice proliferativo elevado e negatividade para receptores.
e) Outros marcadores prognósticos que têm sido utilizados mas não com uso difundido são os marcadores de angiogênese tumoral (a família dos fatores de crescimento do endotélio vascular –VEGFs – e junto com este o CD105 – endogli-

na) e os marcadores de fatores de crescimento epidérmico (EGF). A pesquisa em torno destes marcadores está sendo realizada em várias instituições, principalmente com a possibilidade de serem aplicadas nas assim chamadas "terapias para células-alvo" (1).

Identificação de agentes infecciosos

Uma infinidade de agentes infecciosos (de bactérias a vírus) podem ser identificados através do exame imunoistoquímico. Em alguns casos a sua utilização é "um luxo", mas em muitos ela pode tornar-se uma ferramenta indispensável. Dentre os agentes infecciosos identificáveis por esta técnica podemos citar alguns: micobactérias; Citomegalovírus; vírus Epstein-Barr; Herpes vírus (HHV tipos I, II e II); vírus da hepatite B (AgHbs, AgHBc); Adenovírus; Papilomavírus (HPV); Cândida; Histoplasma; Criptococos; Toxoplasma e Treponema, entre outros. Tradicionalmente alguns desses agentes biológicos são detectados por técnicas de exames diretos; meios de cultura ou avaliação sorológica. Nos pacientes imunodeprimidos as avaliações sorológicas são falhas e a imunoistoquímica pode desempenhar papel relevante, principalmente se associada a técnicas de biologia molecular (PCR) (1).

CONCLUSÃO

Do exposto podemos inferir que a técnica da imunoistoquímica é um auxiliar indispensável no diagnóstico patológico em muitas situações. Porém, devido às múltiplas variáveis envolvidas, deve ser utilizada com prudência e sempre dentro de um contexto completo de informações, preferencialmente em certos casos, com o auxílio de outras técnicas complementares de diagnóstico. A imunoistoquímica envolve muitas etapas e está se tornando uma subespecialidade da patologia; com essas características uma revisão completa sobre o assunto, sob a forma de artigo, é uma tarefa impossível de ser realizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES VFA, BACCHI CE, VASSALO J. Editores. Manual de Imuno-Histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia; 1999; 1-270.
2. SUSTER S, MORAN CA, WICK editores. Seminars in Diagnóstic Pathology. Immunohistochemistry in Tumor Diagnosis, 17 (3); 2000: 169-256.
3. GOWN AM, BACCHI CE. United States and Canadian Academy of Pathology. Educational Materials, 2005. Short Courses. Diagnostic Immunohistochemistry of Solid Tumors. http// www.uscap.org
4. KAPUR RP, BIGLER SA, SKELLY M, GOWN AM. Anti-melanoma Monoclonal Antibody HMB45 Identifies an Oncofetal Glycoconjugated Associated with Immature Melanosomos., The Journal of Histochemistry and Citochemistry. 1992:40 (2); 207-2-12.
5. SHI SR, KEY MC, KALRA KL. Antigen Retrieval in Foormalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating Tisssues. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1991; 39 (6): 741-748.
6. BROOKS J. Update on recent markers in soft tissue tumours (International Society of Bone and Soft Tissue Pathologists). Pathology International 2004; 54 (Suppl. 1): S570–S578Chu PG; Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. Histopathology 2002, 40, 403–439.
7. CHU P, WU E, WEIS LM. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. Mod Pathol 2000; 13(9): 962–972.
8. CHU P, WEIS LM. Expression of Cytokeratin 5/6 in Epithelial Neoplasms: An Immunohistochemical Study of 509 Cases. Mod Pathol 2002; 15(1): 6–10.
9. DE LOTTLB, MORRISON C, SUSTER S, COHN DE, FRANKEL WL. CDX2 Is a Useful Marker of Intestinal-Type Differentiation. A Tissue Microarray–Based Study of 629 Tumors From Various Sites. Arch Pathol Lab Méd. 2005; 129:1100-1105.
10. M VARMA M, JASANI B. Diagnostic utility of immunohistochemistry in morphologically difficult prostate cancer: review of current literature. Histopathology 2005, 47, 1–16.
11. O'CONNELL FP, WANG HH, ODZE RD. Utility of Immunohistochemistry in Distinguishing Primary Adenocarcinomas From Metastatic Breast Carcinomas in the Gastrointestinal Tract. Arch Pathol Lab Med. 2005; 129: 338-347.
12. PILERI AS, GROGAN TM, HARRIS NL, BANKS P, CAMPO E, CHAN JKC, FAVERA RD, DELSOL G, DE WOLF-PEETERS C, FALINI B, GASCOYNE RD, GAULARD P, GATTER KC, ISAACSON PG, JAFFE S, KLUIN P, KNOWLES DM, MASON DY, MORI S, MU H-K, PIRIS MA, RALFKIAER E, STEIN H, SU IJ, WARNKE RA, WEISSLM. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. Histopathology 2002, 41, 1–29.
13. MCKENNA R. Unusual features of the bone marrow. SYMPOSIUM 6B. Histopathology 2002, 41 (Suppl. 2), 93–112.
14. HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOLD J, FLANDRIN G, MULLER-HERMELINK HK, VARDIMAN J. Lymphoma classification — from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms. Ann Oncol 2000; 11 Suppl 1:3–10.
15. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood 1997; 89: 3909–3018.
16. CAMPO E, CHOTT A, KINNEY MC, LEONCINI L, MEIJER CJLM, PAPADIMITRIOU CS, PIRIS MA, STEIN H, SWERDLOW SH. Update on extranodal lymphomas. Conclusions of the Workshop held by the EAHP and the SH in Thessaloniki, Greece. Histopathology 2006, 48, 481–504.
17. DEI TOS AP. Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? Histopathology 2006, 48, 51–62.
18. GENGLER C, GUILLOU L. Solitary fibrous tumour and haemangiopericytoma: evolution of a concept. Histopathology 2006, 48, 63–74.
19. BROOKS J. Update on recent markers in soft tissue tumours (InternationalSociety of Bone and Soft Tissue Pathologists). Pathology International 2004; 54 (Suppl. 1): S570–S578.
20. FISHER C. The comparative roles of electron microscopy and immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. Histopathology 2006, 48, 32–41.
21. SHIDHAM VB, CHIVUKULA M, GUPTA D, RAO N, KOMOROWSKI R.

Immunohistochemical Comparison of Gastrointestinal Stromal Tumor and Solitary Fibrous Tumor Arch Pathol Lab Med. 2002;126: 1189-1192.
22. RUBIN BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. Histopathology 2006, 48, 83–96.
23- ROSSI G, VALLI R, BERTOLINI F, MARCHIONI A, CAVAZZA A, MUCCIARINI C, MIGALDI M, M FEDERICO M, TRENTINI GP: Sgambato A. PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract Histopathology 2005, 46, 522–531.
24. DELELLIS R, LLOIYD R, HEITZ PU, ENG C. Editores. Tumours of Endocrine Organs. Pathology and GeneticsIARC Press, Lyon 2004: 1-320.