

Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica

Primeira submissão em 23/05/05
Última submissão em 13/08/05
Aceito para publicação em 20/09/05
Publicado em 20/10/05

Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology

Betina Werner, MD¹; Antonio Carlos Campos, MD, PhD²; Mehdad Nadji, MD³; Luiz Fernando Bleggi Torres, MD, PhD⁴

unitermos	resumo
Imuno-histoquímica	<p>Objetivo: avaliar o motivo para indicação e analisar o grau de auxílio da imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico de neoplasias e lesões pseudoneoplásicas. Material e método: avaliação retrospectiva observacional e descritiva de 4.459 casos submetidos a análise no laboratório de IHQ do Departamento de Patologia do Jackson Memorial Hospital, Universidade de Miami, Estados Unidos, em 1999. Resultados: 3.706 casos possuíam dados suficientes para o desenvolvimento dos objetivos propostos. Em 19% dos casos a IHQ foi utilizada para determinar fatores prognósticos ou índices proliferativos; em 17% dos casos teve como objetivo identificar microrganismos, células, estruturas ou materiais; e em 64% dos casos teve aplicação diagnóstica propriamente dita. Em 835 casos desta última categoria a IHQ contribuiu para um diagnóstico específico em 83% das vezes e diminuiu o número de diagnósticos diferenciais em 12%. Em 5% das vezes a IHQ não auxiliou o patologista devido a exigüidade de algumas amostras, presença de necrose extensa ou indiferenciação extrema de algumas neoplasias. Os principais problemas de diagnóstico diferencial para os quais a IHQ foi utilizada foram: determinar o local de origem de carcinomas e adenocarcinomas e diferenciar entre hiperplasia mesotelial reacional, mesotelioma e adenocarcinoma, entre outros. Foram utilizados 4,1 anticorpos por caso, em média. Conclusões: Quando bem indicada e aplicada, a imuno-histoquímica é um método diagnóstico complementar útil em 95% dos casos e muitas vezes contribui fundamentalmente para as condutas cirúrgica e terapêutica. Amostras muito exíguas ou necróticas e neoplasias extremamente indiferenciadas são situações que comprometem o exame imuno-histoquímico e seus resultados. Quando utilizada de maneira direcionada aos principais diagnósticos diferenciais, a técnica apresenta uma relação custo/benefício alta.</p>
Neoplasia	
Carcinoma	
Diagnóstico	

abstract key words

Background: Immunohistochemistry (IHC) is a valuable tool in diagnostic surgical pathology. We evaluated the frequency of IHC use and its contribution to the final diagnosis of tumors and pseudotumors. Methods: A retrospective study of the 4,459 cases received in 1999 for immunoperoxidase study at the Immunohistochemistry Laboratory, Department of Pathology, University of Miami/Jackson Memorial Hospital, USA, was performed. Results: 3,706 cases yielded all data necessary for the study. In 19% of cases IHC was used for localization of predictive tumor markers or evaluation of proliferation indicators; 17% of cases performed IHC to identify organisms or acellular structures and in 64% of cases IHC examination was to aid the pathologists in differential diagnosis of tumors. In 835 cases of the latter category, IHC helped the pathologists to render a specific diagnosis in 83% of instances. In 12% IHC narrowed down the diagnostic possibilities to two or three entities. In the remaining 5% of cases, IHC had no contribution to the final diagnosis due to limited diagnostic material, extensive necrosis or lack of tumor differentiation. The main differential diagnosis dilemmas included determination of the site of origin of carcinomas, differentiation between reactive mesothelial hyperplasia, mesothelioma and adenocarcinoma, and demonstration of cell phenotype in undifferentiated neoplasms. The average of antibodies per case was 4.1. Conclusions: Immunohistochemistry is a valuable tool in diagnostic surgical pathology capable of delineating the nature of disease in 95% of cases. In some instances, IHC is essential for the treatment decision-making. On the other hand, limited diagnostic material, extensive necrosis or lack of tumor differentiation can interfere in IHC performance. A well-designed differential diagnosis-driven utilization of the technique is extremely cost-effective.

Immunohistochemistry
Neoplasm
Carcinoma
Differential diagnosis

1. Médica patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Curitiba da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

2. Médico cirurgião e professor titular do Departamento de Clínica Cirúrgica do Hospital de Clínicas de Curitiba da UFPR.

3. Médico patologista e chefe do Immunohistochemistry Laboratory, Department of Pathology, University of Miami/Jackson Memorial Hospital.

4. Professor-titular do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Curitiba da UFPR.

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Curso de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o título Indicações e contribuição diagnóstica da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica, em 26 de novembro de 2002.

Introdução

A imuno-histoquímica surgiu com as pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940. Só a partir de 1974, quando foi possível demonstrar alguns antígenos tissulares pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, é que a imuno-histoquímica foi aceita como um método simples e prático na rotina diagnóstica de patologia cirúrgica^(3, 14, 23, 27, 30). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais, que propiciaram uma enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares, e o advento da recuperação antigênica foram fatos marcantes na evolução da imuno-histoquímica⁽³⁾. Houve tal avanço na contribuição e na aplicação da imuno-histoquímica na patologia cirúrgica que o fenômeno passou a ser conhecido como a revolução marrom do laboratório de histopatologia⁽¹⁴⁾.

As reações imuno-histoquímicas podem ser utilizadas nas mais diferentes situações dentro de um laboratório de patologia cirúrgica. As mais importantes são: 1) elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada; 2) determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; 3) subclassificação de linfomas; 4) pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias; 5) identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células; 6) detecção de células neoplásicas metastáticas^(1, 3, 12, 14, 23, 30, 37).

Apesar de ser um método relativamente simples, a imuno-histoquímica tem certas particularidades e seu resultado é influenciado por diversos fatores, começando pela fixação do espécime, passando pela escolha dos anticorpos a serem analisados em cada caso e pelas reações propriamente ditas, e chegando até a interpretação das lâminas. Ou seja, o grau de utilidade e contribuição da imuno-histoquímica para resolução de problemas em patologia cirúrgica é diretamente proporcional à experiência das mãos que realizam as reações e dos olhos que interpretam os resultados^(1, 12, 14, 23, 30, 37).

Os autores apresentam um estudo retrospectivo observacional e descritivo dos resultados das reações imuno-histoquímicas realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica do Jackson Memorial Hospital, Miami, EUA, no ano de 1999, com a intenção de: 1) analisar a frequência de casos quanto ao sítio de origem da amostra colhida e o número de anticorpos utilizados em cada caso; 2) avaliar o motivo para indicação do exame imuno-histoquímico; 3) analisar o grau de auxílio da imuno-histoquímica para o diagnóstico diferencial de neoplasias e lesões pseudo-

neoplásicas; 4) determinar os fatores que influenciam de maneira negativa o grau de auxílio da imuno-histoquímica para o diagnóstico diferencial de neoplasias e lesões pseudoneoplásicas; e 5) determinar os principais dilemas de diagnóstico diferencial para os quais a imuno-histoquímica é indicada. Os achados são correlacionados com dados da literatura e se discutem os aspectos práticos da aplicação da técnica de imuno-histoquímica na rotina diária da patologia cirúrgica.

Material e método

Utilizaram-se 4.459 exames imuno-histoquímicos realizados durante o ano de 1999 no laboratório de imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da University of Miami/Jackson Memorial Hospital, EUA. Todas as reações foram realizadas naquele laboratório e o método imuno-enzimático usado foi o estreptavidina-biotina-peroxidase; a recuperação antigênica foi realizada com aquecedor a vapor, quando necessário. As reações foram realizadas de maneira automatizada pelo aparelho Dako Autostainer Universal Staining System.

As seguintes variáveis foram analisadas: 1) órgão ou local da biópsia; 2) qualidade do material (biópsia ou preparado citológico); e 3) número de anticorpos por caso. Os casos foram classificados de duas maneiras: uma em relação ao motivo da indicação para o exame imuno-histoquímico e outra em relação ao grau de contribuição da imuno-histoquímica para o diagnóstico final.

Quanto ao motivo de indicação para o exame imuno-histoquímico, os casos foram classificados em três categorias:

- A. determinação de fatores prognósticos ou índices proliferativos (ex.: análise do receptor de estrogênio no carcinoma mamário);
- B. identificação de microrganismos, células, estruturas ou materiais (ex.: detecção da presença do vírus da hepatite B em biópsias hepáticas);
- C. definição diagnóstica, onde os casos foram subdivididos em três outras categorias:

1) categoria confirmatória: a imuno-histoquímica foi utilizada para confirmar a hipótese diagnóstica formulada nas lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) (ex.: confirmação do diagnóstico de melanoma em neoplasia com origem na epiderme);

2) categoria diagnóstico diferencial: quando a imuno-histoquímica foi utilizada no diagnóstico diferencial de

lesões neoplásicas e pseudoneoplásicas suspeitadas nas lâminas coradas em HE. Nesses casos foram determinados os dilemas de diagnósticos diferenciais para os quais a imuno-histoquímica foi aplicada (ex.: diferenciar carcinoma de melanoma, definir o sítio primário de adenocarcinomas, classificar linfomas, entre outros);

3) categoria miscelânea: a imuno-histoquímica foi utilizada para diagnóstico em situações não citadas anteriormente (ex.: definição de hormônios secretados por tumores de hipófise, análise dos ductos hepáticos em fígados transplantados, entre outros).

Quanto ao grau de contribuição da imuno-histoquímica no diagnóstico final, nos casos da categoria definição diagnóstica, os mesmos foram classificados em: 1) a imuno-histoquímica rendeu um diagnóstico específico; 2) a imuno-histoquímica diminuiu o número de diagnósticos diferenciais; ou 3) a imuno-histoquímica não contribuiu para a conclusão diagnóstica. Os motivos pelos quais a imuno-histoquímica não auxiliou no diagnóstico final foram igualmente avaliados.

Resultados

No ano de 1999, o Departamento de Patologia do Jackson Memorial Hospital realizou 32.558 biópsias, 41.432 citologias e recebeu 3.990 casos para consulta em patologia cirúrgica e citopatologia, provenientes de outras regiões dos EUA e de outros países.

Nesse mesmo ano, a unidade de imuno-histoquímica daquele hospital realizou 4.459 exames. A **Figura 1** mostra um organograma que explica o modo pelo qual todos os casos foram classificados, analisados e quantificados. Em 3.706 casos foi possível a obtenção do mínimo de dados necessários para o desenvolvimento dos objetivos propostos. Destes, 3.431 eram biópsias e 275 eram preparados citológicos.

Motivo de indicação para o exame imuno-histoquímico

Nos 3.706 casos em que todos os dados necessários para a realização deste trabalho estavam disponíveis, 699 tiveram como motivo de solicitação de exame imuno-histoquímico a determinação de fatores prognósticos ou índices proliferativos; a imuno-histoquímica foi utilizada para identificação de microrganismos, células, estruturas ou materiais em 644 casos; e em 2.363 casos a imuno-histoquímica foi utilizada para definir o diagnóstico (**Figura 2**).

Definição diagnóstica (n = 2.363)

Em relação às três categorias nas quais eles foram subdivididos, 179 casos fizeram parte da categoria confirmatória, 117 da categoria miscelânea e 2.067 da categoria diagnóstico diferencial.

Análise dos casos da categoria diagnóstico diferencial

Dos 2.067 casos dessa categoria, escolheram-se 835 casos que foram analisados pelo mesmo patologista (Mehdad Nadji), desde a formulação dos diagnósticos diferenciais nas lâminas coradas em HE e escolha do painel de anticorpos até a interpretação dos resultados imuno-histoquímicos. Os três locais de biópsias mais frequentes foram fígado, com 90 casos; pulmão, com 78 casos; e linfonodo, com 58 casos.

Grau de auxílio da imuno-histoquímica no diagnóstico diferencial (n = 835)

A **Figura 3** mostra os resultados desta categoria: a IHQ contribuiu para um diagnóstico específico em 693 casos, diminuiu o número de diagnósticos diferenciais em 103 e em 39 vezes não auxiliou o patologista. Exigüidade de algumas amostras (n = 22), presença de necrose extensa (n = 7) ou indiferenciação extrema de algumas neoplasias (n = 10) foram os motivos pelos quais a imuno-histoquímica não auxiliou o patologista, como mostra o **Figura 4**. O número de anticorpos, por caso, variou de um a 15, com média de 4,1 anticorpos por caso.

Dilemas de diagnóstico diferencial para os quais a imuno-histoquímica foi útil (n = 796)

Foram encontradas 12 situações diferentes:

- determinação do órgão de origem ou sítio primário de carcinoma (ex.: hepatocarcinoma *versus* adenocarcinoma metastático): n = 242;
- determinação do tipo de linfoma (ex.: linfoma B de grandes células *versus* linfoma anaplásico): n = 30;
- diagnóstico diferencial entre processo neoplásico e pseudo-neoplásico (ex.: tecido de granulação e carcinoma): n = 37;
- diferenciação entre hiperplasia linfóide ou infiltrado inflamatório e linfoma, ou plasmocitose reacional e plasmocitoma ou mieloma múltiplo: n = 32;
- diferenciação entre hiperplasia mesotelial reacional, mesotelioma e adenocarcinoma: n = 87;
- determinação o tecido de origem de neoplasias fusocelulares benignas e malignas (ex.: leiomiossarcoma *versus* tumor do estroma gastrintestinal): n = 61;
- diferenciação entre carcinoma e melanoma: n = 32;

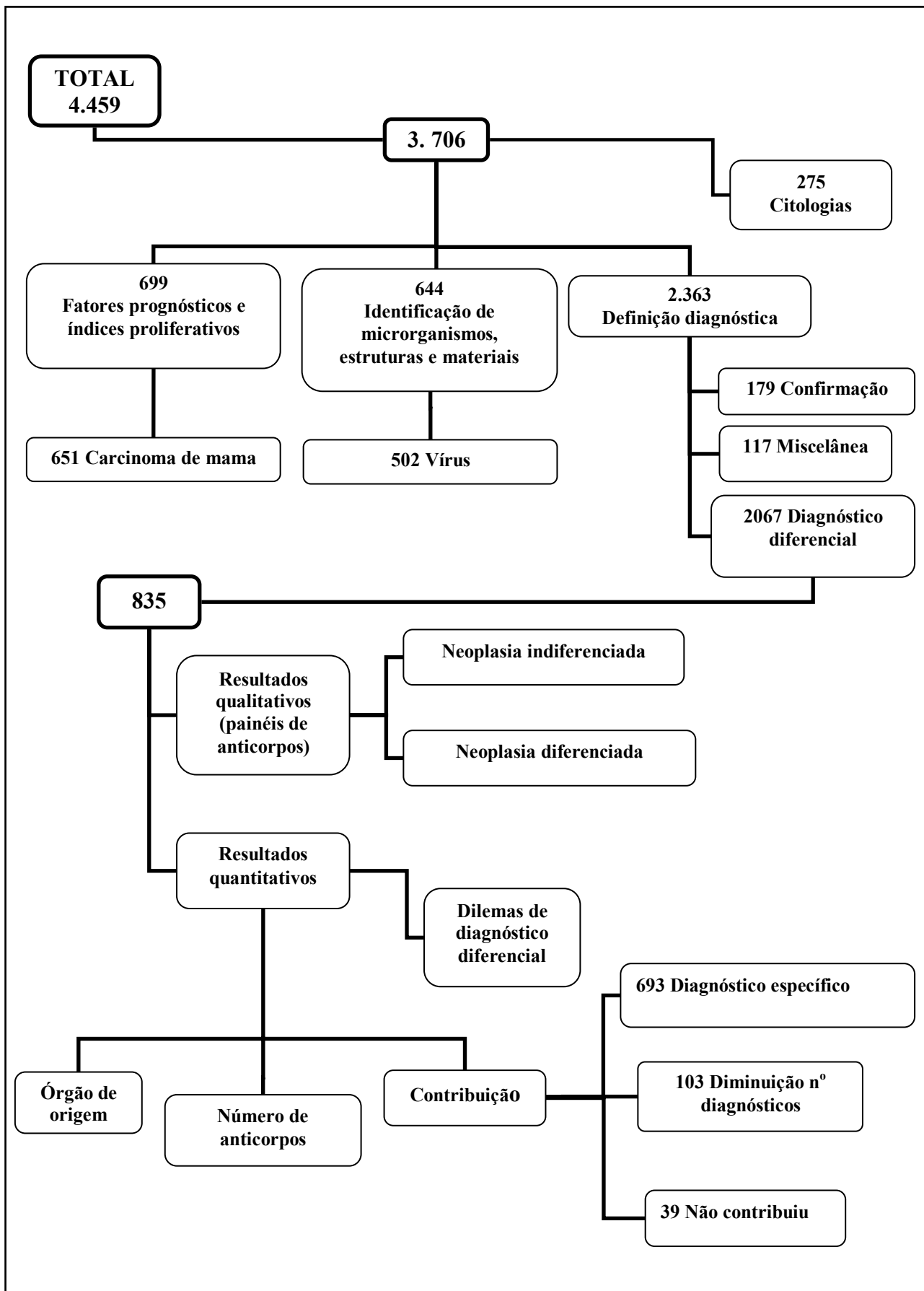


Figura 1 – Organograma dos resultados: maneira pela qual os dados foram classificados, analisados e quantificados

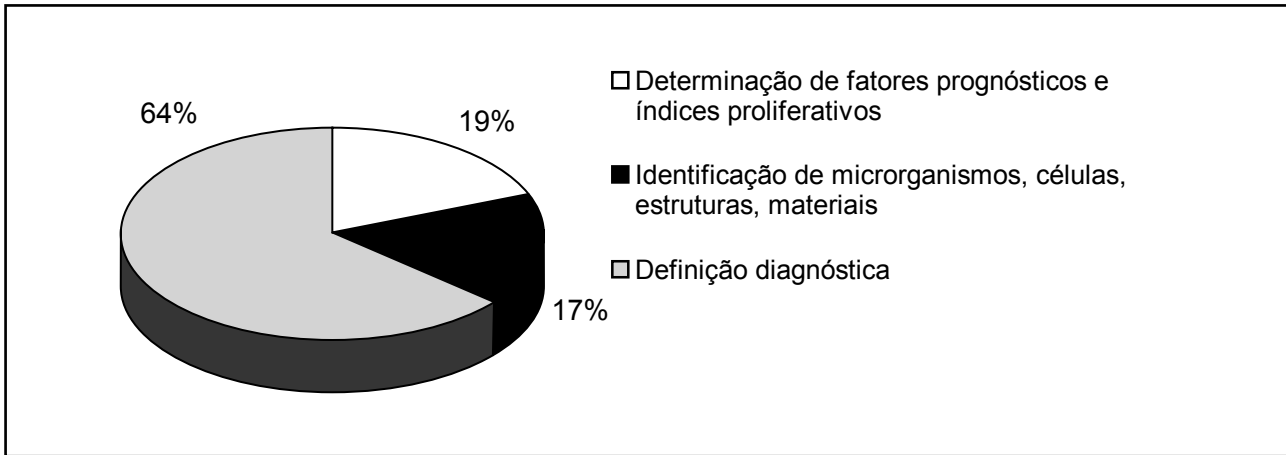


Figura 2 – Resultados quanto ao motivo de indicação para o exame imuno-histoquímico (n = 3.706)

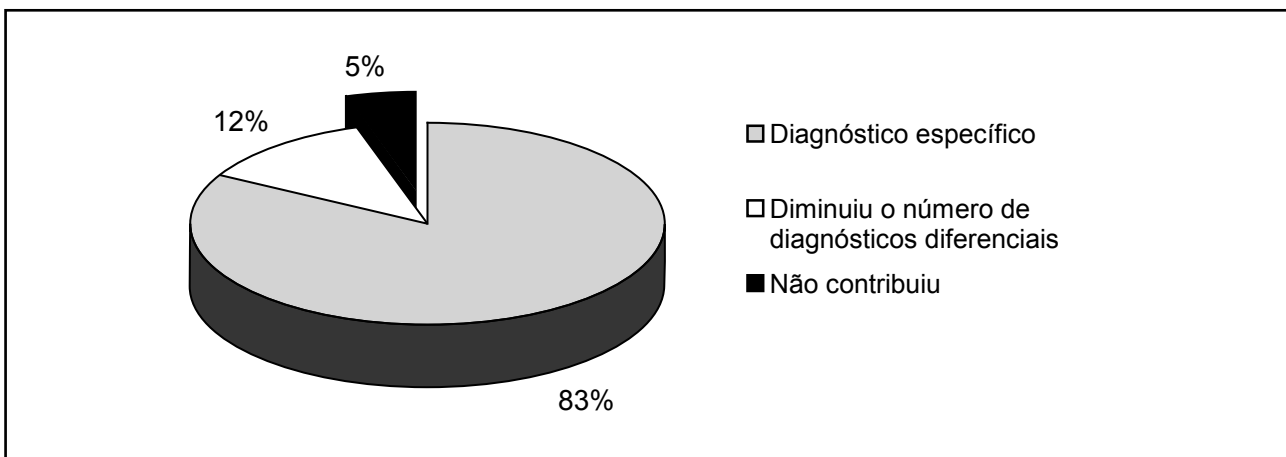


Figura 3 – Grau de contribuição da imuno-histoquímica para o diagnóstico final (n = 835)

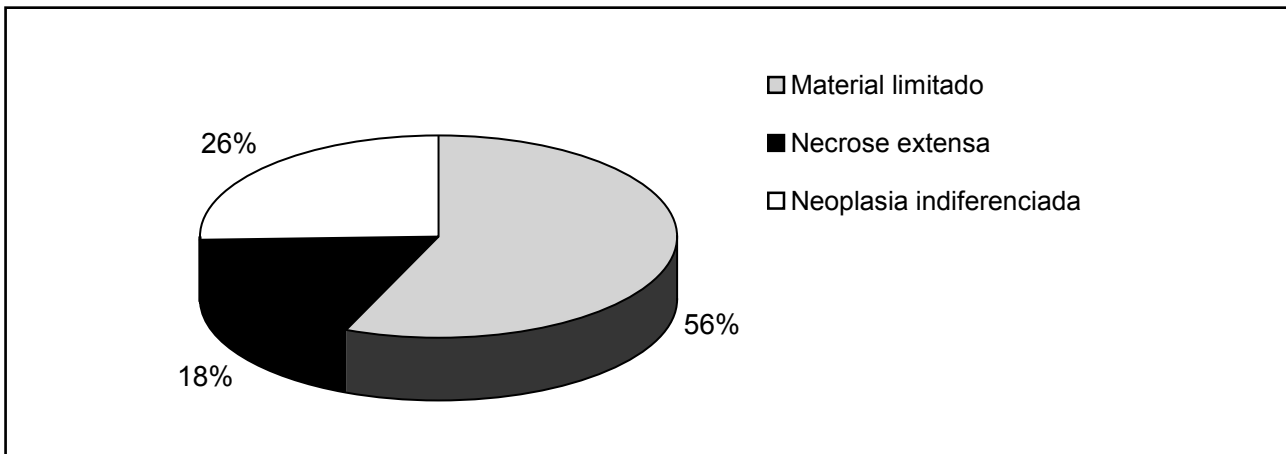


Figura 4 – Motivos pelos quais a imuno-histoquímica não auxiliou no diagnóstico final (n = 39)

- diferenciação entre carcinoma e linfoma: n = 59;
- diferenciação entre carcinoma e sarcoma: n = 51;
- determinação do tecido de origem de neoplasia maligna totalmente indiferenciada, com mais de dois diagnósticos diferenciais (ex.: carcinoma versus melanoma versus linfoma): n = 70;

- diferenciação de neoplasia maligna de células pequenas e azuis⁽⁸⁾, que inclui sarcoma de Ewing, tumor primitivo neuroectodérmico periférico (PNET), neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, tumor desmoplásico de células redondas, linfoma/leucemia, carcinoma de pequenas células, osteossarcoma de pequenas células e condrossarcoma mesenquimal: n = 19;

• resolução de problemas de diagnósticos diferenciais não citados anteriormente (ex.: glioblastoma *versus* carcinoma metastático): $n = 76$.

Discussão

Desde a sua introdução, na década de 70, as publicações científicas com aplicações da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica aumentaram significativamente (**Figura 5**). Esse fato apenas reflete a posição que a imuno-histoquímica hoje ocupa em um laboratório de patologia cirúrgica, ou seja, a de técnica complementar indispensável na resolução de certos problemas de diagnóstico diferencial formulados nas lâminas coradas com a coloração básica de rotina de HE^(1, 3, 11, 12, 14, 17, 20, 21, 23, 25, 29, 30-32, 36, 37).

Contribuição da imuno-histoquímica na solução de problemas de diagnósticos diferenciais em patologia cirúrgica

Leong e Wright, patologistas australianos, escreveram o primeiro artigo que avalia a contribuição da imuno-histoquímica na área de diagnóstico de tumores⁽¹⁴⁾. Dos 958 tumores da rotina cirúrgica que necessitaram de imuno-histoquímica no Instituto de Ciências Médicas e Veterinárias na cidade de Adelaide, em 1986, os autores escolheram 200 casos consecutivos e classificaram-nos em uma de cinco categorias: 1) a imuno-histoquímica confirmou o diagnóstico suspeito nas lâminas coradas em HE; 2) a imuno-histoquímica contribuiu para o diagnóstico definitivo a partir de uma lista de diagnósticos diferenciais; 3) a imuno-histoquímica

contribuiu por excluir algum diagnóstico diferencial; 4) a imuno-histoquímica não foi de auxílio nenhum para o diagnóstico; e 5) a imuno-histoquímica rendeu um diagnóstico não suspeitado previamente. Segundo os autores, a imuno-histoquímica foi particularmente de grande auxílio nos diagnósticos diferenciais entre linfoma anaplásico e carcinoma, e na identificação de melanoma amelanótico; além disso, a escolha de um painel de anticorpos baseado nos diagnósticos presumidos nas lâminas coradas em HE é de grande ajuda para a diferenciação de tumores de células anaplásicas e fusiformes.

O presente estudo apresenta várias semelhanças e algumas diferenças quando comparado ao artigo de Leong e Wright⁽¹⁴⁾. A semelhança principal é a motivação de se classificar por categorias os tipos de contribuição ou os motivos de indicação do exame imuno-histoquímico, para avaliar sua real contribuição no diagnóstico definitivo de neoplasias. A principal diferença entre os dois estudos é que neste não existe a categoria e a imuno-histoquímica rendeu um diagnóstico não suspeitado previamente nas lâminas coradas em HE. Quando os resultados da imuno-histoquímica eram muito discrepantes do que foi suspeitado nas lâminas coradas em HE, o diagnóstico final firmado no laudo se restringia a um diagnóstico menos específico, do tipo neoplasia maligna pouco diferenciada, e uma nota sugeria alguns diagnósticos diferenciais suspeitados nas lâminas coradas em HE. Nesses casos, a imuno-histoquímica era considerada não-auxiliar para o diagnóstico final. Isso enfatiza o papel complementar, e não principal, da imuno-histoquímica na análise histopatológica.

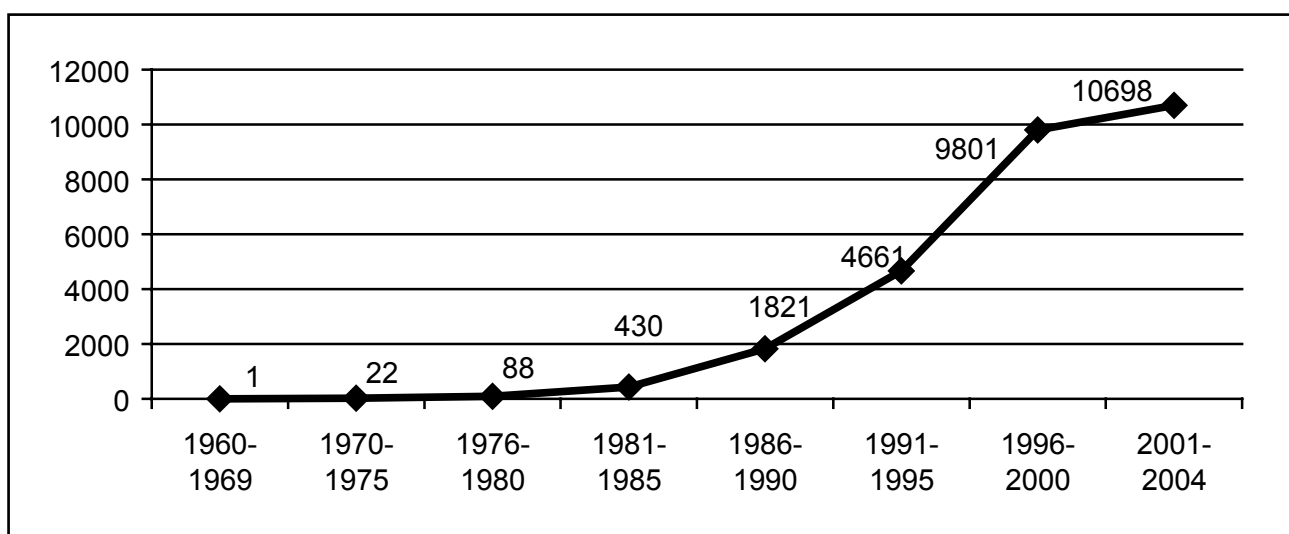


Figura 5 – Número de publicações científicas encontradas na pesquisa através do Medline, entre 1960 e 2004, onde o termo imuno-histoquímica aparece no título ou resumo dos trabalhos (limitando-se a estudos realizados em humanos)

No presente estudo existem duas categorias não utilizadas por aqueles autores: a categoria A (determinação de fatores prognósticos e índices proliferativos) e a categoria B (identificação de microrganismos, células, estruturas ou materiais). Sobre a primeira categoria, vale a pena salientar que o carcinoma de mama, com a pesquisa dos receptores de estrogênio e progesterona, além de HER2/neu, p53 e Ki67 algumas vezes, foi responsável por 93,2% dos casos. Já a pesquisa de vírus foi o principal componente da categoria B, com 78% dos casos. Essa prevalência de resultados é esperada, uma vez que o carcinoma de mama é uma das neoplasias mais comuns e a imuno-histoquímica é consagrada na determinação de alguns índices prognósticos e terapêuticos^(10, 33, 35, 37). Do mesmo modo, a detecção de vírus pelo método imuno-histoquímico preenche uma lacuna diagnóstica da coloração de rotina de HE, pois muitas vezes não há alterações morfológicas características que indiquem a presença de uma infecção viral⁽³⁷⁾.

Até onde se sabe, existem dois outros trabalhos baseados no estudo de Leong e Wright⁽¹⁴⁾, ambos nacionais: o de Schmitt *et al.*⁽²⁵⁾, de 1991, e o de Torres *et al.*, de 1998⁽³²⁾. Os dois trabalhos utilizaram as categorias propostas pelos primeiros autores, com algumas modificações. Os patologistas do estudo de Schmitt *et al.*⁽²⁵⁾ apresentaram resultados muito semelhantes aos daqueles autores e ressaltaram que a experiência do patologista que escolhe os anticorpos e interpreta os resultados imuno-histoquímicos é o fator mais importante para a eficiência da imuno-histoquímica no diagnóstico de tumores. Torres *et al.*⁽³²⁾ expuseram a sua experiência de dez anos de uso da imuno-histoquímica num hospital geral de Curitiba em artigo publicado em 1998, revisando o artigo previamente publicado pelos autores em 1995⁽³¹⁾. Os autores classificaram os casos de uma maneira semelhante à de Leong e Wright⁽¹⁴⁾; em 94,1% dos casos a imuno-histoquímica auxiliou de alguma maneira na definição do diagnóstico.

No presente trabalho a imuno-histoquímica rendeu um diagnóstico específico em 693 casos, ou 83%; a imuno-histoquímica diminuiu o número de diagnósticos diferenciais, auxiliando parcialmente o patologista em 103 casos, ou 12%; e a imuno-histoquímica não contribuiu para a conclusão diagnóstica em 39 casos, ou 5%. Isso significa que em 95% dos casos nos quais o patologista está diante de um caso de diagnóstico difícil nas lâminas coradas em HE, a imuno-histoquímica pode ajudá-lo a firmar se não o diagnóstico correto pelo menos um diagnóstico apropriado.

Situações em que a imuno-histoquímica não contribui na solução de problemas de diagnósticos diferenciais em patologia cirúrgica

No presente estudo a imuno-histoquímica não contribuiu para o diagnóstico final em 5% dos casos, e nos trabalhos de Leong e Wright⁽¹⁴⁾, Schmitt *et al.*⁽²⁵⁾ e Torres *et al.*⁽³²⁾ as taxas foram de 13,5%, 12% e 5,9% respectivamente. As razões encontradas pelos autores daqueles estudos para explicar a falta de contribuição da imuno-histoquímica para a resolução diagnóstica foram diferentes. Segundo Leong e Wright⁽¹⁴⁾ os principais fatores que impediram que a imuno-histoquímica contribuísse para o diagnóstico final foram resultados inespecíficos e contraditórios das colorações imuno-histoquímicas em alguns tumores e a fixação inadequada dos espécimes. Já Schmitt *et al.*⁽²⁵⁾ apontam a fixação inadequada em formol como o principal fator complicador, seguido da extrema indiferenciação de algumas das neoplasias estudadas. Torres *et al.*⁽³²⁾ culpam a fixação inadequada, a exigüidade da amostra estudada e a total indiferenciação de certas neoplasias como as razões da inutilidade da imuno-histoquímica na resolução dos dilemas em diagnósticos diferenciais.

Juntamente com os três artigos mencionados anteriormente, várias outras publicações comentam a influência negativa do processamento tecidual e da fixação em formol, adequada ou não, sobre as reações imuno-histoquímicas^(2, 9, 15, 17, 21, 28, 29, 37). Apesar disso, aquele não foi um problema encontrado no presente estudo. Os motivos que impediram a imuno-histoquímica de auxiliar o patologista na decisão diagnóstica final foram: 1) extrema indiferenciação de algumas neoplasias, onde todos os marcadores testados tiveram resultados negativos; 2) presença de necrose extensa em determinadas neoplasias, onde além de provocar intensa coloração inespecífica, o pouco tecido neoplásico viável foi insuficiente para a interpretação das reações; e 3) exigüidade da amostra, cujo tecido disponível não foi quantitativamente suficiente para a realização das reações imuno-histoquímicas necessárias.

Pode-se notar que o estudo de Torres *et al.*⁽³²⁾ possui a taxa mais semelhante à do presente estudo, e é, ao mesmo tempo, o mais recentemente publicado, em 1998. Os casos avaliados no trabalho de Schmitt *et al.*⁽²⁵⁾ eram na maioria da década de 80, e no caso de Torres *et al.*⁽³²⁾, os casos, em sua maioria eram da década de 90. Os casos usados no estudo de Leong e Wright⁽¹⁴⁾ eram ainda mais antigos. A época de realização dos três estudos pode ter influenciado o grau de auxílio da imuno-histoquímica em cada caso, já que a disponibilidade de anticorpos e as técnicas de recu-

peração antigênica eram diferentes. Além de ter um maior número de anticorpos à sua disposição, todas as reações efetuadas no Laboratório de Imuno-histoquímica do Jackson Memorial Hospital, naquele ano, foram feitas de maneira automatizada, e todos os casos foram submetidos às técnicas de recuperação antigênica mais adequadas para cada anticorpo. Esses fatos podem explicar a menor importância da condição de preservação do tecido e dos epitopos antigênicos na qualidade das reações imuno-histoquímicas e, conseqüentemente, na contribuição da imuno-histoquímica para a decisão diagnóstica final^(4, 18, 24).

Escolha dos anticorpos e interpretação dos resultados da imuno-histoquímica

Além de todo cuidado técnico necessário para que as reações imuno-histoquímicas sejam de qualidade e possam ser interpretadas de maneira correta pelo patologista, a fase de escolha dos anticorpos a serem testados, após a análise da lâmina corada em HE, é igualmente importante^(4, 12, 17, 21, 24, 28, 29).

Rudiger *et al.*⁽²⁴⁾ testaram a proficiência de 172 patologistas alemães nos quesitos qualidade de reações imuno-histoquímicas dos seus laboratórios e capacidade de interpretação dos resultados para a composição de um diagnóstico final adequado. Cada patologista recebeu uma lâmina corada em HE e cinco lâminas não-coradas, para escolher os anticorpos mais pertinentes e realizar as reações imuno-histoquímicas. Apenas 57% dos casos enviados aos patologistas retornaram com os diagnósticos finais corretos, e a baixa sensibilidade de algumas reações não foi relacionada com os erros diagnósticos. Os autores concluem que não é a qualidade das reações, mas a escolha dos anticorpos, a interpretação das colorações e a integração dos resultados imuno-histoquímicos ao diagnóstico suscitado nas lâminas coradas em HE que são importantes para a formulação de um diagnóstico final pertinente. Essas observações vão de encontro ao que é demonstrado neste trabalho: a imuno-histoquímica é eficaz quando há uma escolha direcionada do painel de anticorpos e este último fator é extremamente dependente da experiência do patologista.

No presente trabalho, a imuno-histoquímica foi aplicada tanto em casos inflamatórios como em neoplásicos, e a escolha dos painéis de anticorpos variou de caso para caso, tanto no tipo quanto na quantidade. Nos 835 casos estudados na categoria diagnóstico diferencial, o número de anticorpos por caso variou de um a 15, com média de 4,1 anticorpos por caso. Como explicado anteriormente, esse grupo de 835 casos foi analisado por um único patologista

que, por sua vez, é o patologista de maior experiência na área. Diagnósticos diferenciais mais simples necessitaram um menor número de anticorpos, e diagnósticos diferenciais complexos, como nos casos de neoplasias malignas indiferenciadas, solicitaram um maior número de anticorpos. Torres *et al.*⁽³²⁾ apresentam a média de 5,1 anticorpos utilizados por caso, número bastante semelhante ao do presente estudo.

No presente estudo houve 70 casos de neoplasias indiferenciadas (9%); nesses casos a imuno-histoquímica é indispensável para o diagnóstico correto, especialmente em tumores de partes moles⁽⁷⁾. Seguindo o raciocínio para formular os diagnósticos diferenciais, primeiro as neoplasias indiferenciadas devem ser classificadas segundo o tamanho e o tipo celular e, em seguida, escolhe-se o painel com o número mínimo de anticorpos necessários para a resolução do problema em questão. A imuno-histoquímica não tem o poder de determinar se a neoplasia é benigna ou maligna⁽³⁾. Toda vez que um anticorpo for incluído na lista de anticorpos a serem testados, a pergunta "o que um resultado positivo ou negativo para este anticorpo vai influenciar no diagnóstico final?" deve ser formulada. Somente se a questão tiver uma resposta coerente o anticorpo deve ser usado. Essa medida, além de reduzir os gastos de uma unidade de imuno-histoquímica, colabora para a manutenção da utilidade do método em patologia cirúrgica. Geralmente, quanto menor o número de diagnósticos diferenciais suspeitos nas lâminas coradas em HE, ou seja, quanto maior a experiência do patologista, menor é o número de anticorpos do painel imuno-histoquímico escolhido pelo mesmo. Conseqüentemente, quanto menor o número de reações a serem analisadas, menor é o número de variáveis, e mais preciso é o diagnóstico final^(4, 12, 24, 28, 29). Como mencionado por Linder⁽¹⁵⁾, não existem anticorpos 100% específicos e sensíveis. Geralmente, os anticorpos mais específicos podem ser pouco sensíveis, anticorpos com grande sensibilidade podem se tornar inespecíficos, e existem neoplasias que realmente são totalmente indiferenciadas, ou melhor, não apresentam qualquer positividade aos marcadores imuno-histoquímicos hoje conhecidos.

Aplicação diagnóstica direcionada da imuno-histoquímica

Adenocarcinomas e carcinomas primários versus adenocarcinomas e carcinomas metastáticos

A combinação dos resultados imuno-histoquímicos das citoqueratinas 7 e 20 pode ajudar bastante na definição do

sítio primário da neoplasia: adenocarcinoma metastático de cólon é caracteristicamente negativo para a citoqueratina 7 e positivo para a citoqueratina 20; positividade para ambas as citoqueratinas sugere ovário (quando a neoplasia é mucinosa), pâncreas, trato biliar ou urotélio como sítios primários; já a positividade apenas para a citoqueratina 7 não rende diagnóstico específico, pois a grande maioria dos adenocarcinomas comporta-se imuno-histoquimicamente dessa maneira^(1, 13, 16, 34, 36). Outros anticorpos que podem ser inseridos em um painel para determinação de sítios primários de adenocarcinomas são o antígeno de membrana epitelial e o antígeno carcinoembrionário. O primeiro é especialmente útil para se descartarem hipóteses diagnósticas de carcinoma hepatocelular, adrenal ou embrionário, já que o antígeno de membrana epitelial quase nunca é positivo nessas neoplasias^(1, 36). O antígeno carcinoembrionário é positivo em alguns adenocarcinomas, como o de origem gastrointestinal, pulmonar e o carcinoma medular de tireóide, e exibe um padrão de coloração canalicular nos hepatocarcinomas. O valor diagnóstico do antígeno carcinoembrionário está no fato de ele ser quase sempre negativo em carcinomas renais, prostáticos, ovarianos e no mesotelioma maligno^(1, 13, 16, 36). Além dos já comentados, o fator de transcrição da tireóide (TTF-1) define origem pulmonar ou tireoidiana, o antígeno prostático específico demonstra a origem prostática de uma neoplasia, e o receptor de estrógeno sugere origem mamária, uterina ou ovariana de algumas neoplasias^(1, 26, 36). Em 242 casos deste estudo, o maior grupo da categoria analisada, foram utilizados um ou mais anticorpos citados anteriormente. Por esse motivo, o domínio do significado dos resultados positivos ou negativos para as reações com as citoqueratinas 7 e 20, antígeno carcinoembrionário, antígeno de membrana epitelial, TTF-1, antígeno prostático específico e receptor de estrógeno são fundamentais para o patologista que solicita o exame imuno-histoquímico. Outros marcadores que passaram a ser utilizados mais recentemente são: HLA-DR, para o diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo indiferenciado; p16 como marcador de infecção por HPV de alto grau em carcinomas de colo uterino; AMACR humana (P404S), que é expressa apenas em glândulas prostáticas neoplásicas; e antígeno de Thomsen Freidenreich (T-F), que marca o carcinoma sebáceo (comunicações pessoais de Mehdad Nadji).

Diferenciação entre hiperplasia mesotelial reacional, mesotelioma e adenocarcinoma

Ordóñez⁽¹⁹⁾ fez uma ampla revisão sobre todos os anticorpos que podem ser úteis para a diferenciação da-

que as duas neoplasias. O autor conclui que os melhores marcadores para serem utilizados na diferenciação entre mesotelioma epitelial e adenocarcinoma são a calretinina e a citoqueratina 5/6, que são expressas nos mesoteliomas e não nos adenocarcinomas; e o antígeno carcinoembrionário, que é expresso nos adenocarcinomas e não nos mesoteliomas epiteliais. Apesar de existirem algumas controvérsias na literatura^(5, 6, 22), a hiperplasia mesotelial reacional é geralmente negativa para o antígeno da membrana epitelial ou apresenta fraca positividade, é negativa para o antígeno carcinoembrionário e reage positivamente com a calretinina; o mesotelioma é difuso e intensamente positivo para o antígeno da membrana epitelial e a calretinina, sendo negativo para o antígeno carcinoembrionário. No presente estudo, a imuno-histoquímica foi indicada para a tentativa de diferenciar hiperplasia mesotelial reacional, mesotelioma e adenocarcinoma em 11% dos casos usando calretinina, antígeno carcinoembrionário e antígeno de membrana epitelial.

Definição de tecido de origem de neoplasias fusocelulares

Segundo diversos autores^(1, 30, 36), os anticorpos úteis para definição de tecido de origem de uma neoplasia fusocelular são a proteína S100, a desmina, o CD34 e o CD31, e esses foram os marcadores usados em 61 casos deste trabalho. Por via de regra, leiomiomas e leiomiossarcomas são positivos para a desmina, que é o filamento intermediário das células musculares, e negativos para a proteína S100 e para o CD34; schwannomas e sarcomas neurogênicos são negativos para a desmina e o CD34 e positivos para a proteína S100; tumores estromais gastrointestinais são positivos para o CD34 e geralmente negativos para a desmina e a proteína S100; e tumores de origem vascular são positivos para CD31 e negativos para os outros marcadores citados^(1, 30, 36). A caldesmonina (caldesmon/h-CD/proteína contrátil celular) é um novo marcador de células musculares lisas e vem sendo utilizada em algumas situações de diagnóstico diferencial; além disso, o HHV-8 passou a ser utilizado para confirmação de sarcomas de Kaposi relacionados à infecção pelo HIV (comunicações pessoais de Mehdad Nadji).

Neoplasia maligna de células pequenas e azuis

Esse grupo inclui o sarcoma de Ewing, o tumor primitivo neuroectodérmico periférico (PNET), o neuroblastoma, o rabiomiossarcoma, o tumor desmoplásico de células redondas, alguns linfomas ou leucemias, o carcinoma de pequenas células, o carcinoma de Merkel, o osteossarcoma de pequenas células e o condrossarcoma mesenquimal^(1, 8, 30, 36).

Devoe e Weidner⁽⁸⁾ revisaram os aspectos imuno-histoquímicos aplicados a esses tumores e discutiram os anticorpos mais úteis em cada situação. Os anticorpos utilizados para o diagnóstico diferencial em 19 casos do presente estudo e os resultados mais comumente encontrados estão expostos na **Tabela**.

Carcinoma mamário

Nos 699 casos em que a imuno-histoquímica foi utilizada para determinação de fatores prognósticos ou índices proliferativos, a pesquisa de receptores hormonais e de marcadores de proliferação celular em carcinomas de mama foi o grupo mais prevalente, com 651 casos (93,2%). O receptor de estrógeno e o HER2 são os únicos marcadores solicitados de rotina desde 1999 (p53, Ki67 e receptor de progesterona apenas são utilizados quando requisitados). No entanto, mais recentemente, a e-caderina passou a auxiliar na diferenciação entre carcinomas ductal e lobular, sendo positivo no primeiro. Outras inovações foram: o uso do p63 para diagnóstico diferencial entre carcinoma tubular e adenose esclerosante (onde ele é positivo no carcinoma) e entre carcinoma metaplásico e carcinoma ductal (onde ele é positivo no metaplásico) e a introdução do HLA-DR, que é positivo no carcinoma medular e negativo no carcinoma ductal (comunicações pessoais de Mehdad Nadji).

Indicação do exame imuno-histoquímico e relação custo/benefício

Wick, Ritter e Swanson⁽³⁸⁾ discutem o impacto dos resultados da imuno-histoquímica na decisão do tipo de tratamento a ser oferecido ao paciente. Dentro desse contexto, eles comentam que a imuno-histoquímica tem papel fundamental quando é usada para identificar

agentes infecciosos e definir a linhagem celular de origem da neoplasia. Já quando a imuno-histoquímica é aplicada para determinação de fatores prognósticos ou índices proliferativos, na opinião dos autores, o método tem valor questionável quando se analisa a importância do resultado na decisão terapêutica. Por outro lado, Leong e Wright⁽¹⁴⁾ concluem que a imuno-histoquímica é um teste que apresenta relação custo/benefício positiva, mas que as reações devem sempre ser interpretadas com cautela, levando em conta os achados morfológicos das lâminas coradas em HE e os dados clínicos. Raab⁽²⁰⁾ tomou como exemplo três situações com pacientes e tumores diferentes, e analisou hipoteticamente as diferentes conseqüências e os custos de tratamento se a imuno-histoquímica fosse ou não realizada, com relação à expectativa de vida dos pacientes, à exatidão diagnóstica e ao prognóstico. O autor prova que mesmo se a imuno-histoquímica custasse cinco a dez vezes mais, ainda assim traria grandes vantagens no seu uso. Em contrapartida, no estudo de Torres, Noronha e Telles⁽³¹⁾ o percentual de casos do laboratório que foram submetidos a reações imuno-histoquímicas foi de 0,73% (todos casos de biópsias), apontando a diligência na indicação da técnica. Já no Jackson Memorial Hospital de Miami, por ser hospital de referência em patologia e em imuno-histoquímica nos Estados Unidos, essa taxa foi de 9,3% nas biópsias e 0,6% nos preparados citológicos. Esses valores mostram, especialmente no caso do estudo brasileiro, que a imuno-histoquímica contribui positivamente na balança custo/benefício numa pequena parcela de casos, e consolida a sua posição de ferramenta complementar e não essencial para o exercício da patologia cirúrgica de um modo geral^(14, 20).

Tabela 1 Painel básico de anticorpos utilizados para diferenciação de algumas neoplasias malignas indiferenciadas de células pequenas

	KER	LCA	S100	DESM	CD99
Carcinoma	+	-	-	-	-
Linfoma	-	+	-	-	-
Melanoma	-	-	+	-	-
Rabdomiossarcoma	-	-	-	+	-
Sarcoma de Ewing	-	-	-	-	+

KER: queratina; LCA: antígeno leucocitário comum; S100: proteína S-100; DESM: desmina; CD99: glicoproteína MIC 2; +: resultado positivo na grande maioria dos casos; -: resultado negativo na grande maioria dos casos.

Referências

1. ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
2. BATTIFORA, H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol*, v. 96, n. 5, p. 669-71, 1991.
3. BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther*, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002.
4. CHAN, J. K. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Sem Diagn Pathol*, v. 17, n. 3, p. 170-7, 2000.
5. CHIENG, D. C. et al. Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous fluids. *Cancer*, v. 90, n. 3, p. 194-200, 2000.
6. COMIN, C. E. et al. Calretinin, thrombomodulin, CEA, and CD15: a useful combination of immunohistochemical markers for differentiating pleural epithelial mesothelioma from peripheral pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol*, v. 32, n. 5, p. 529-36, 2001.
7. COINDRE, J. M. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology*, v. 43, n. 1, p. 1-16, 2003.
8. DEVOE, K.; WEIDNER, N. Immunohistochemistry of small round-cell tumors. *Semin Diagn Pathol*, v. 17, n. 3, p. 216-24, 2000.
9. ELIAS, J. M. et al. Special report: quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. *Am J Clin Pathol*, v. 92, n. 6, p. 836-43, 1989.
10. GANCSBERG, D. et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol*, v. 113, p. 675-82, 2000.
11. HSI, E. D. A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. *Arch Pathol Lab Med*, v. 125, n. 2, p. 289-94, 2001.
12. JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. J. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest*, v. 22, n. 3, p. 445-65, 2004.
13. LAGENDIJK, J. H. et al. Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry: differential diagnosis between colonic and ovarian carcinomas as primary sites. *Hum Pathol*, v. 29, n. 5, p. 491-7, 1998.
14. LEONG, A. S.-Y.; WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology*, v. 11, n. 12, p. 1295-1305, 1987.
15. LINDER, J. Immunohistochemistry in surgical pathology. The case of the undifferentiated malignant neoplasm. *Clin Lab Med*, v. 10, n. 1, p. 59-76, 1990.
16. McCLUGGAGE, W. G. Recent advances in immunohistochemistry in the diagnosis of ovarian neoplasms. *J Clin Pathol*, v. 53, n. 5, p. 327-34, 2000.
17. NADJJI, M. Immunoperoxidase techniques. Facts and artifacts. *Am J Dermatopathol*, v. 8, n. 1, p. 32-6, 1986.
18. O'LEARY, T. J. Standardization in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Molec Morphol*, v. 9, n. 1, p. 3-8, 2001.
19. ORDONEZ, N. G. Role of immunohistochemistry in differentiating epithelial mesothelioma from adenocarcinoma. Review and update. *Am J Clin Pathol*, v. 112, n. 1, p. 75-89, 1999.
20. RAAB, S. S. The cost-effectiveness of immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, v. 124, n. 8, p. 1185-91, 2000.
21. RICKERT, R. R.; MALINIAK, R. M. Intralaboratory quality assurance of immunohistochemical procedures. Recommended practices for daily application. *Arch Pathol Lab Med*, v. 113, n. 6, p. 673-9, 1989.
22. ROBERTS, F. et al. Immunohistochemical analysis still has a limited role in the diagnosis of malignant mesothelioma. A study of thirteen antibodies. *Am J Clin Pathol*, v. 116, n. 2, p. 253-62, 2001.
23. ROSAI, J. Special techniques in surgical pathology. In: Ackerman's *Surgical Pathology*. 8 ed. Nova York: Mosby-Year Book, 1996. p. 29-62.
24. RUDIGER, T. et al. Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol*, v. 26, n. 7, p. 873-82, 2002.
25. SCHMITT, F. C. et al. Utilidade dos métodos imuno-histoquímicos para o diagnóstico anatomopatológico. *Rev Hosp Clin Facul Med São Paulo*, v. 46, p. 26-30, 1991.
26. SRODON, M.; WESTRA, W. H. Immunohistochemical staining for thyroid transcription factor-1: a helpful aid in discerning primary site of tumor origin in patients with brain metastases. *Hum Pathol*, v. 33, p. 642-5, 2002.
27. SWANSON, P. E. Hierarchical: the state of the art in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*, v. 107, n. 2, p. 139-40, 1997.
28. TAYLOR, C. R. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Hum Pathol*, v. 25, n. 1, p. 2-11, 1994.
29. TAYLOR, C. R. The total test approach to standardization of immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, v. 124, n. 7, p. 945-51, 2000.
30. TAYLOR, C. R.; COTE, R. J. Major Problems in Pathology. 2 ed. Nova York: WB Saunders, 1994. v. 19: *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*.
31. TORRES, L. F. B.; NORONHA, L.; TELLES, J. E. A importância da imuno-histoquímica no diagnóstico anatomopatológico em hospital geral: análise de 885 casos. *J Bras Patol Lab Med*, v. 31, n. 2, 1995.
32. TORRES, L. F. B. et al. A contribuição da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. *Rev Med Paraná*, v. 56, n. 2, p. 31-8, 1998.
33. TORRES, L. F. B. et al. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação do carcinoma de mama: análise dos receptores de estrogênio, progesterona e antígeno carcinoembrionário em 320 casos. *Rev Med Paraná*, v. 53, n. 3/4, p. 28-34, 1996.
34. TOT, T. Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumors. *Cancer*, v. 85, n. 1, p. 171-7, 1999.

35. VANG, R. et al. Immunohistochemical determination of HER-2/neu expression in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, v. 113, p. 669-74, 2000.
36. WEISS, L. M.; CHANG, K. L. Practical applications of immunohistochemistry. Short course handout. In: United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, 1999.
37. WERNER, M. et al. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, v. 24, n. 7, p. 1016-9, 2000.
38. WICK, M. R.; RITTER, J. H.; SWANSON, P. E. The impact of diagnostic immunohistochemistry on patient outcomes. *Clin Lab Med*, v. 19, n. 4, p. 794-814, 1999.

Endereço para correspondência

Luiz Fernando Bleggi Torres
Serviço de Anatomia Patológica
Hospital de Clínicas de Curitiba
Rua General Carneiro, 181
CEP 80600-900 – Curitiba-PR