

# Imunoperoxidase no Diagnóstico de Neoplasias Indiferenciadas

CARLOS THADEU SHIMIDT CERSKI\*  
 FERNANDO ROCHA DE OLIVEIRA\*\*  
 PATRÍCIA WARNCKE ASHTON\*\*  
 ADELIR BOLZZONI\*\*

## SINOPSE

Os autores examinaram retrospectivamente 37 neoplasias malignas indiferenciadas (NMI) através da técnica de imunoperoxidase, com um painel mínimo de anticorpos; antígeno comum leucocitário (LCA), proteína S100 e citoqueratina de baixo peso molecular (AE1). Apesar do material examinado não ter seguido previamente processamento técnico ideal, a sensibilidade obtida, de 57%, e a especificidade, de 100%, são plenamente satisfatórias.

UNITERMOS: Imunoperoxidase, Anticorpos, Neoplasias malignas indiferenciadas, Diagnóstico

## INTRODUÇÃO

A terapêutica quimioterápica de neoplasias evoluiu muito nos últimos anos e, embora bons resultados possam ser alcançados, ela é uma terapêutica específica e de eficácia variável, de acordo com as diferentes origens tumorais. A especificidade do tratamento torna inaceitável, na prática, um diagnóstico anatomopatológico tão inespecífico como o de neoplasia maligna indiferenciada (NMI).

Felizmente, as possibilidades diagnósticas através da imuno-histoquímica também aumentaram muito nos últimos anos. Destas técnicas, a imunoperoxida-

## ABSTRACT

*Immunoperoxidase Method in the diagnosis of malignant undifferentiated neoplasms*

The authors made a retrospective study of 37 malignant undifferentiated neoplasms by immunoperoxidase method, employing a small antibody panel: leucocyte common antigens (LCAs), S100 protein, Keratin (AE1). Although the previous technical processing had been inadequate the sensitivity of 57% and specificity of 100% were considered completely satisfactory.

KEYWORDS: Immunoperoxidase, Antibodies, Undifferentiated neoplasms, Diagnosis

se é uma das mais empregadas<sup>1, 2, 3</sup>. Ela utiliza a especificidade e a sensibilidade dos anticorpos para a identificação e a localização de antígenos em cortes de tecidos. Isso possibilita ao patologista não apenas o reconhecimento de alterações morfológicas, mas, também, de características antigênicas do tecido em exame. Hoje, existe uma infinidade de marcadores (anticorpos mono e policlonais) disponíveis para a identificação dos mais diversos antígenos de células neoplásicas indiferenciadas. O alto custo desses marcadores, porém, restringe a sua ampla utilização na rotina do laboratório de patologia.

O presente trabalho foi elaborado com o objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade de um painel mínimo de marcadores em neoplasias previamente classificadas como malignas e indiferenciadas no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), durante o período de dois anos. O painel mínimo utilizado constitui-se de três anticorpos: antígeno comum leucocitário (LCA), proteína S-100 e ceratina de baixo peso molecular (AE1).

## MATERIAL E MÉTODOS

Revisaram-se 47 casos previamente diagnosticados como neoplasias malignas indiferenciadas prove-

Trabalho realizado no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS.

\* Professor-Adjunto do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS.

\*\* Doutorandos da Faculdade de Medicina da UFRGS.

Endereço: Rua João Abott, n.º 686. CEP 90430 - Porto Alegre, RS. Tel.: 331-2418.

Recebido em 18/04/91. Para modificação do autor em 23/07/91. Recebido da última modificação em 02/09/91. Aceito para publicação em 09/09/91.

nientes do Serviço de Anatomia Patológica do HCPA referentes ao período de janeiro de 1988 a dezembro de 1989. Esses casos corresponderam a 0,25% do total (18.727) de exames anatomopatológicos realizados no período. Quanto às características morfológicas, 27 (57%) eram constituídos por neoplasias malignas de pequenas células (NMPC), 9 (19%) por neoplasias malignas de células anaplásicas (NMCA), 6 (13%) por neoplasias malignas de células fusiformes (NMCF) e 5 (11%) por neoplasias malignas sem outras especificações (NMSE). Todos os casos haviam sido incluídos em parafina e examinados através das colorações convencionais.

Os marcadores utilizados foram: antígeno comum leucocitário (Dako mouse monoclonal anti-leucocyte common antigen-LCA, clone PD7/26 e ZB11, class IgG1,Kappa); proteína S100 (Dako rabbitt anti-cow S100-IgG fraction) e ceratina de baixo peso molecular (Bio Genex Laboratories, mouse monoclonal low molecular weight cytokeratin antibody, class IgG1-AE1)<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8</sup>.

A técnica utilizada foi a do sistema avidina-biotina, originalmente descrita por Hsu<sup>9</sup>, com algumas modificações. Inicia-se com duas etapas sucessivas de desparafinização (a primeira por 30 min com xilol I a 60°C e a segunda por 20 min com xilol II a temperatura ambiente) seguidas de uma bateria de álcool para hidratação (5 etapas de 2 min com álcool absoluto I, II, III, IV, V). Realiza-se, então, a lavagem em água corrente, com água destilada, e, posteriormente, o bloqueio da peroxidase endógena com 10 volumes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% 2 vezes por 5 min.

Após procede-se a nova lavagem em água corrente, água destilada e tampão-fosfato. Posteriormente, adiciona-se tripsina, 15 a 20 mg em 100 ml de PBS + 134 mg de CaCl<sub>2</sub> com pH ajustado para 7,8 por 20 a 30 min, na temperatura de 37 °C. Adiciona-se o soro normal (da espécie animal do anticorpo secundário) por 20 min, a 37 °C. Escorre-se o soro normal e incuba-se com anticorpo primário por uma hora, a 37 °C.

Posteriormente, realizam-se três lavagens em tampão-fosfato por 10 min e incuba-se o corte com o anticorpo secundário, a 37 °C, por 30 min, seguido de mais três lavagens de tampão, por 10 min. Logo após, acrescenta-se ABC (complexo avidina-biotina) por 30 min a 37 °C (1ul avidina + 1ul biotina + 1 ml PBS), seguidos de mais três lavagens em tampão-fosfato por 10 min. Acrescenta-se DAB (diaminobenzidina) por 3 min (30 mg de DAB + 100 ml de PBS + 1,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volumes). Lava-se em água corrente e água destilada. Por fim, realiza-se a contracoloração com hematoxilina de Mayer por 5 min, lava-se novamente com água corrente e água destilada, adiciona-se carbonato de lítio. Após desidrata-se e monta-se.

Como controles-positivos foram utilizados cortes de melanoma para a proteína S100, cortes de pele normal para a citoqueratina AE1 e cortes de amígdala palatina para o controle de LCA. Como controles-negativos foram empregados os mesmos cortes aci-

ma, apenas substituindo-se os anticorpos primários por tampão-fosfato.

## RESULTADOS

Do total de 47 casos previamente selecionados em nosso estudo, 10 (21,2%) foram perdas referentes a amostras sem tumor residual (3 casos=6,4%), e o restante (7 casos=14,9%) foram amostras cujo material original foi completamente desgastado. Dos restantes 37 casos, 16 (43%) tiveram resultados negativos para os 3 antígenos pesquisados. Os outros 21 casos (57%) mostraram positividade para apenas um dos 3 antígenos específicos. Assim, 8 casos (22%) foram positivos para AE1, 7 casos (19%) foram positivos para LCA e 6 (16%) casos foram positivos para proteína S100.

Nos 37 casos estudados, pudemos observar que 21 (57%) eram neoplasias malignas de pequenas células (NMPC); 7 (19%) eram neoplasias malignas de células anaplásicas (NMCA); 6 (16%) eram neoplasias malignas de células fusiformes (NMCF) e 3 (8%) eram neoplasias malignas sem especificação da morfologia celular (NMSE) (Tabela 1).

TABELA 1 — MORFOLOGIA X MARCADORES TUMORAIS

	AE1	LCA	S100	Neg.	Total
NMPC	5(14%)	7(19%)	0 (0%)	9(24%)	21 (57%)
NMCA	3 (9%)	0 (0%)	3 (8%)	1 (3%)	7 (19%)
NMCF	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	4(11%)	6 (16%)
NMSE	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (5%)	3 (8%)
Total	8(22%)	7(19%)	6(16%)	16(43%)	37(100%)

Fazendo a correlação das amostras positivas para um antígeno com a classificação morfológica celular, observamos que 5 dos casos positivos para AE1 eram NMPC e 3 NMCA, enquanto 7 casos LCA positivos corresponderam a NMPC.

Dos casos positivos para S100, 3 eram NMCA, 2 eram NMCF e 1 era uma NMSE.

Por fim, correlacionando as amostras negativas para os 3 antígenos com a classificação morfológica, observamos que 9 casos eram NMPC, 1 caso era NMCA, 4 casos eram de NMCF e 2 eram casos de neoplasias malignas sem outras especificações.

## DISCUSSÃO

Os 37 casos submetidos a este painel mínimo apresentaram positividade para somente um ou nenhum dos marcadores utilizados. Esse achado confirma a boa especificidade (100%) dos marcadores, conforme relatado na literatura<sup>4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11</sup>.

A sensibilidade por nós encontrada foi de 57%, não reproduzindo os resultados de outros autores<sup>9, 10</sup>, o que pode ser devido a pelo menos dois fatores. O primeiro deles diz respeito às NMI por nós examinadas: NMPC, NMCA e NMCF. Ou seja, não selecionamos os diferentes tipos de NMI.

Enquanto isso, outros autores restringiram-se às NMPC ou NMCA, onde a dúvida diagnóstica corresponde à diferenciação entre carcinoma x linfoma e carcinoma x melanoma, respectivamente, não incluindo as NMCF<sup>9, 10</sup>.

O painel mínimo por nós utilizado, adequado na avaliação das NMI de pequenas células e células anaplásicas, mostrou-se insuficiente quando o objetivo de análise são NMI de células fusiformes.

O segundo fator estaria relacionado às condições técnicas da amostra estudada. O nosso material foi submetido a inclusão em parafina com temperatura superior a 60 °C e a tempos excessivamente longos de fixação em formalina não-tamponada<sup>11</sup>. Esses dois fatores são responsáveis pela destruição de antígenos celulares, o que determina o achado de resultados fal-

so-negativos e, conseqüentemente, diminui a sensibilidade do método.

Apesar do material por nós examinados não ter seguido um processamento técnico adequado, a utilização de um painel exíguo de anticorpos foi suficiente para a resolução de 57% dos casos. Tal sensibilidade, juntamente com a especificidade de 100% numa amostra fixada em formalina e incluídos em parafina sem cuidados prévios maiores, nos indica que o painel mínimo de anticorpos utilizados oferece um resultado plenamente satisfatório. Se acrescentarmos a isto alguns cuidados, como o controle de temperatura da parafina durante a inclusão, uma fixação adequada e um painel de anticorpos mais amplo especialmente para as neoplasias malignas de células fusiformes, a sensibilidade esperada deverá ser muito maior.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hsu SM, Raine L, Protein A, and Biotin in Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29 (11): 1349-53.
- Gatter KC, Alcock C, Heryet A, Mason DY. Clinical importance of analysing malignant tumours of uncertain origin with immunohistological techniques. *Lancet* June 8 1985; 1302-5.
- Kahn HJ, Marks A, Thom H, Baumal R. Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 341-7.
- Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimosato Y, Ishihara K. Histochemical demonstration of S100 protein Malignant Melanoma and Pigmented Nevus, and its diagnostic application. *Cancer* 1982; 50: 912-8.
- Gabbiani G, Kapanie Y, Barazzone P, Franke WW. Immunohistochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol* 1981; 104 (3): 206-16.
- Warncke RA, Gatter KC, Phil D, et al. Diagnosis of human lympho-

ma with monoclonal anti leucocyte antibodies. *N Engl J Med* 1983; 309: 1275-81.

- Kindblom LG, Lodding P, Rosengren L, Baudier J, Haglid K. S100 protein in melanocytic tumors. *Acta Path Microb Immunol Scand Sect A* 1984; 92: 219-30.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and Avidin-Biotin Complex Method for studying polypeptide hormones with Radioimmunoassay Antibodies. *Am J Clin Pathol* May 1981; 75: 734.
- Gatter K, Alcock C, Heryet A. The differential diagnosis of routinely processed anaplastic tumors using monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 33-43.
- Michie SA, Spagnolo DV, Dunn KA, Warnke RA, Rouse RV. A panel approach to the evaluation of the sensitivity and specificity of antibodies for the diagnosis of routinely processed histologically Undifferentiated Human Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 457-62.
- Battifora H. Immunohistochemistry in tumor diagnosis-Tissue fixation and Processing. *USA Can Acad Pathol* 1990: 5-7.