

CAPÍTULO 34

HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DA PELE

*Juan Piñeiro-Maceira
Mírian Nacagami Sotto*

INTRODUÇÃO

O patologista há muito tempo suplementa as técnicas histológicas tradicionais com várias colorações especiais utilizadas para caracterizar diversos constituintes celulares, visando identificar e classificar os diferentes tipos de neoplasias cutâneas. O ácido periódico de Schiff (PAS) é um exemplo de coloração muito utilizada pela sua capacidade de identificar células que contêm glicogênio; o método de Masson-Fontana localiza o pigmento melânico, informando a capacidade de células neoplásicas produzirem ou armazenarem melanina, e indicando indiretamente sua histogênese; os métodos tricrômicos de Masson ou Gomori são úteis na coloração de células de natureza muscular. Contudo, a grande variedade de antígenos tissulares endógenos (hormônios, enzimas, imunoglobulinas, fatores

de coagulação) só raramente é detectada com algum grau de especificidade pelos métodos histoquímicos de coloração. Além disso, a demonstração histoquímica de enzimas tissulares requer procedimentos especiais que, em geral, não são compatíveis com o processamento histológico de rotina. Já o emprego de técnicas imuno-histoquímicas para localização de enzimas nos tecidos oferece uma alternativa que não depende da preservação da atividade catalítica da enzima, mas apenas de sua estrutura. Por exemplo, a coloração do verde-metila-pironina detecta imunoglobulinas de uma forma indireta e inespecífica; a intensa pironinofilia do citoplasma dos plasmócitos é devida à grande quantidade de ácido ribonucléico usada na produção de imunoglobulinas. Mas a identificação precisa dos produtos de secreção dos plasmócitos, ou seja, a classe da imunoglobulina e alterações nas

proporções das cadeias leves têm importância fundamental na classificação dos linfomas e podem ser detectadas por meio de técnicas imuno-histoquímicas. Estas cada vez mais encontram aplicação no diagnóstico em patologia; anti-soros contendo anticorpos específicos podem ser usados para localizar diferentes antígenos tissulares por meio de técnicas variadas, com sensibilidade e especificidades maiores do que as oferecidas pelas colorações histoquímicas, e sua compatibilidade com o processamento histológico habitual facilita o emprego na rotina diagnóstica dos laboratórios de patologia.

As técnicas imuno-histoquímicas têm sofrido um contínuo processo de padronização, mas três aspectos continuam a ser de suma importância para obtenção de resultados consistentes e aceitáveis: a necessidade da utilização de controles do anticorpo e da coloração, a eliminação da imunorreatividade cruzada inespecífica e o bloqueio da atividade endógena de peroxidase e biotina em alguns tecidos. A penetração dos anticorpos em cortes de tecido emblocado em parafina em geral não apresenta maiores problemas, mas o efeito da fixação habitual com formol neutro a 10% precisa, em muitos casos, ser antagonizado pelos métodos de recuperação antigênica.

Entre os vários métodos disponíveis, o que atualmente encontra a mais ampla aceitação entre nós é o que emprega o complexo avidina-biotina (ABC). Esta técnica utiliza três reagentes: um anticorpo primário, um anticorpo secundário quimicamente ligado à vitamina biotina e um complexo da glicoproteína avidina

com a biotina e a peroxidase. A avidina possui a habilidade de se ligar não imunologicamente a quatro moléculas de biotina, o que confere excelente sensibilidade a esse método. Enzimas são catalisadores que agem sobre um substrato, acelerando sua conversão. A peroxidase usada em imuno-histoquímica reage com o peróxido de hidrogênio, quando em presença de um doador de elétrons, formando uma molécula colorida. A enzima não sofre depleção e continuamente catalisa a reação, produzindo muitas moléculas coloridas que vão permitir, então, observar ao microscópio óptico o local no tecido em que ocorreu imunorreatividade. Exemplos de doadores de elétrons (cromógenos) disponíveis para uso são: 3,3-tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB) e 3-amino-9-etilcarbazol (AEC); o primeiro produz um produto final castanho e permite que a lamínula seja montada com resina; o segundo resulta em coloração vermelha, e a lamínula deve ser montada com meio aquoso. Uma identificação válida do antígeno-alvo somente pode ser conseguida se o anticorpo for usado na concentração ideal. As instruções do fabricante dos reagentes industrializados devem ser utilizadas como ponto de partida, mas para cada anticorpo a diluição correta sofre influência de cada solução empregada e de cada procedimento realizado na amostra: fixação, processamento, seleção de tampões, temperatura, umidade e tempo da técnica de coloração, para citar apenas alguns. Por isso, pequenos ajustes podem ser necessários para alguns anticorpos em diferentes laboratórios. A

chave para resultados uniformes e significativos é a manutenção de consistência em todas as fases do procedimento.

O resultado dessas técnicas deve ser a localização do pigmento colorido com uma reprodutibilidade confiável. O processo interpretativo mais difícil envolve discernir entre imunorreatividade específica e inespecífica. Os problemas nessa avaliação são em geral de dois tipos: ou há muita reatividade, com excessiva coloração de fundo, e uma coloração aparentemente inespecífica de áreas que não deveriam conter o antígeno em questão, ou os cortes histológicos apresentam reação muito fraca, ou completamente negativa. No primeiro caso, deve-se iniciar com a substituição do anticorpo primário por tampão; se a reação persistir positiva, certamente há problemas com o sistema de detecção empregado ou com a amostra, e ambos devem ser investigados por partes. No caso de resultados falso-negativos, o primeiro passo é certificar-se de que o antígeno realmente está presente na amostra; em seguida o cromógeno deve ser testado, e a utilização de soluções mais concentradas do anti-soro pode ser tentada. Contudo, nunca se deve esquecer de utilizar controles positivos para checar a confiabilidade de cada reação realizada.

NEOPLASIAS MELANOCÍTIICAS

O exame histopatológico na coloração pela hematoxilina-eosina em geral possibilita o diagnóstico dessas lesões sem maio-

res problemas, observados os critérios bem estabelecidos na literatura. Contudo, um certo grupo de casos, representado por formas raras de melanoma e formas pouco diferenciadas, vai representar um desafio diagnóstico maior e nessas situações a imuno-histoquímica, com o emprego de um ou mais entre os marcadores disponíveis para linhagem melanocítica (proteína S-100, HMB-45, NKI/C3, tirosinase, melan-A), será de grande importância na definição do diagnóstico (Fig. 34-1). Nos melanomas hipomelanóticos, além da marcação imuno-histoquímica, também a coloração pelo método de Fontana-Masson pode contri-

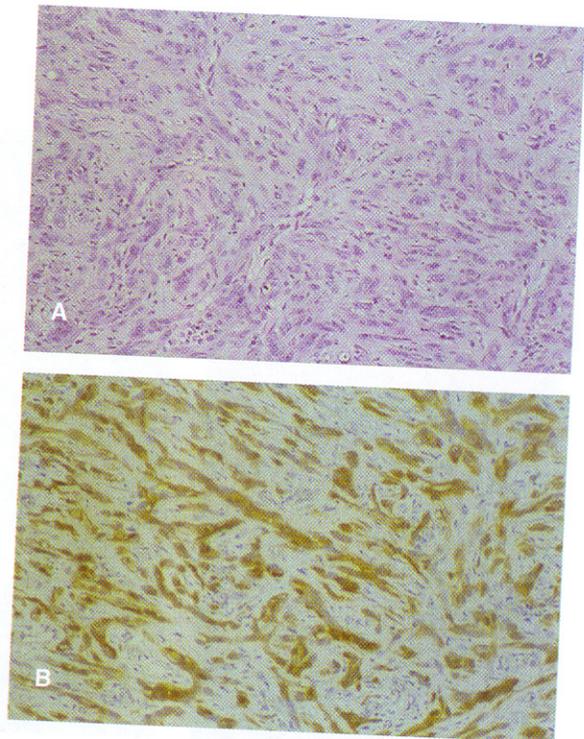


Fig. 34-1. Forma pouco diferenciada de melanoma com predomínio de células fusiformes (A, hematoxilina-eosina/H&E), exibindo intensa imunorreatividade com anti-soro S-100 (B).

buir para a elucidação diagnóstica ao revelar pequenas quantidades de pigmento melânico no citoplasma de células neoplásicas.

NEOPLASIAS LINFÓIDES

As modernas técnicas imuno-histoquímicas permitem analisar o padrão fenotípico das lesões linfoproliferativas com anticorpos para subtipos de linfócitos e células

acessórias (macrófagos, células reticulares dendríticas e células interdigitadas) em amostras de tecido processado rotineiramente e embocado em parafina, ou em amostras de tecido congelado.

Os anti-soros CD45, CD45RO, CD3 e CD20, que funcionam em tecido embocado em parafina, são de ampla utilização para a caracterização de neoplasias de natureza linfóide (CD45/LCA), de linhagem T (CD45RO e CD3) ou B (CD20) (Fig. 34-2).

Os clones anormais nas formas iniciais de linfomas T tendem a ser do subtipo

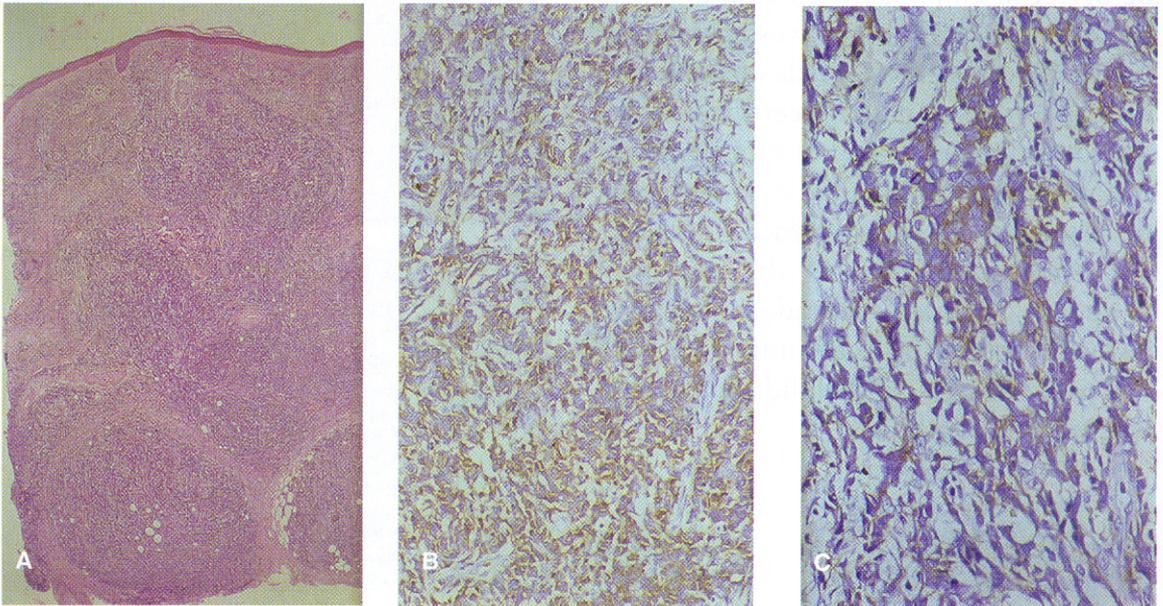


Fig. 34-2. Linfoma B - Extenso comprometimento dérmico e hipodérmico por células linfóides atípicas (A, H&E), cuja natureza linfóide foi confirmada pela imunomarcagem com CD45/LCA (B), sendo em sua maioria imunorreativas com marcador pan-B (C).

CD4 auxiliador, e freqüentemente não expressam um ou mais dos antígenos de maturação pan-T característicos de células T maduras. Os anticorpos monoclonais da série Leu1 a 5, que devem ser empregados em tecido congelado, podem ser úteis (Leu1, 4 e 5 são marcadores dos antígenos de maturação celular pan-T; Leu3 marca as células T “auxiliadoras” CD4-positivas e Leu2, as células T “supressoras” CD8-positivas). Um perfil típico consistente com linfoma T em fase inicial é composto por células epidermotrópicas predominantemente CD4-positivas (relação CD4:CD8 superior a 10:1), além de perda de reatividade de muitas células para um ou

mais dos antígenos definidos pelos anticorpos Leu1, Leu4 ou Leu5.

Com relação à diferenciação entre infiltrados de células B de natureza reacional *versus* maligna, a detecção imunohistoquímica da expressão monotípica de cadeias leves kappa ou lambda pelas células malignas é sugestiva de um processo clonal de provável natureza maligna. Entretanto, o diagnóstico diferencial entre linfoma cutâneo de células T não-epidermotrópico, linfoma B e hiperplasia linfóide cutânea é freqüentemente problemático.

A imunorreatividade com o anti-soro CD30 parece definir uma “família” de

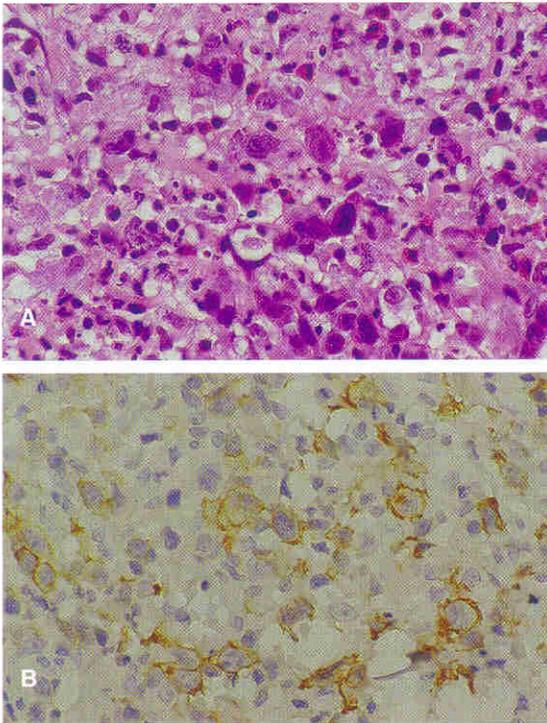


Fig. 34-3. Acentuado pleomorfismo nuclear e hiperchromasia em infiltrado dérmico de papulose linfomatóide (A, H&E) e imunomarcção com anti-soro CD30 (B).

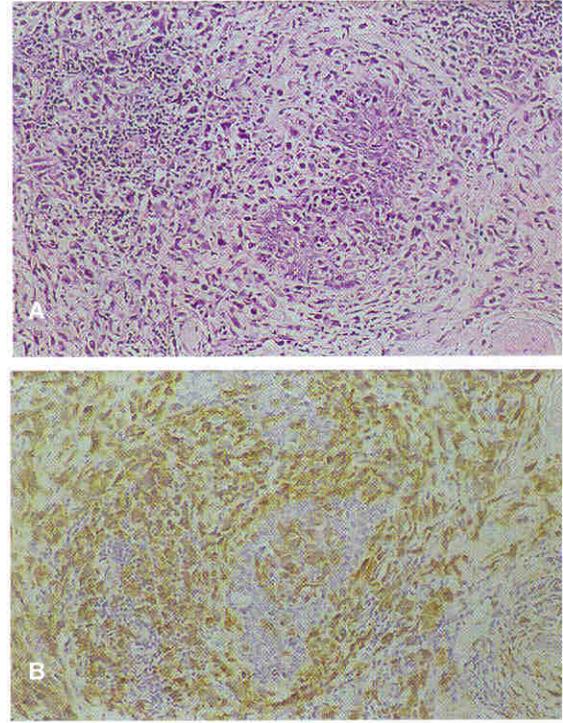


Fig. 34-4. Linfoma cutâneo caracterizado por infiltração difusa de linfócitos grandes e anaplásicos (A, H&E), apresentando imunorreatividade com anti-soro CD30 (B).

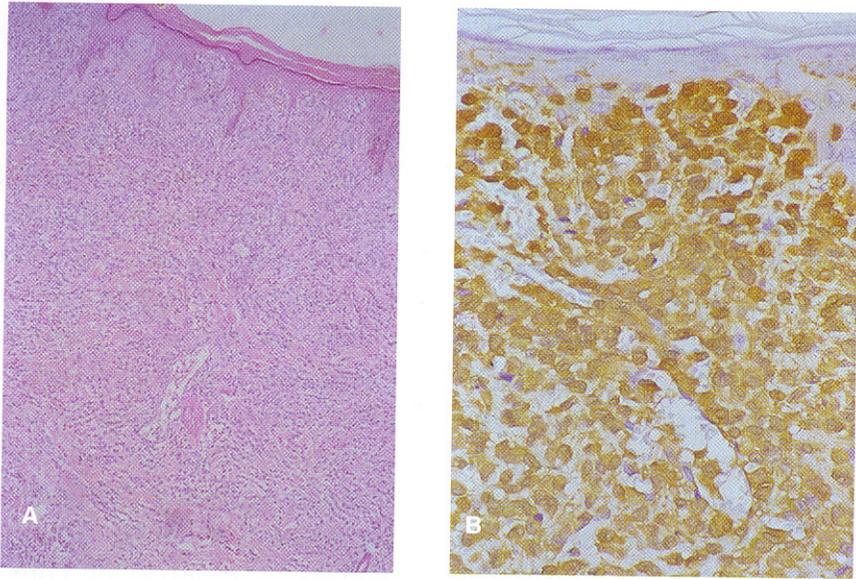


Fig. 34-5. Característico comprometimento da junção dermoepidérmica e da derme por infiltrado confluyente de grandes células de amplo citoplasma eosinofílico na histiocitose de células de Langerhans (A, H&E) e detalhe da imunomarcção com anti-soro S-100 (B).

neoplasias linfóides: papulose linfomatóide (Fig. 34-3), linfoma anaplásico de grandes células (Fig. 34-4) e histiocitose atípica regressiva.

A imuno-histoquímica das lesões cutâneas da histiocitose de células de Langerhans demonstra positividade para proteína S-100 (Fig. 34-5) que, contudo, não é um marcador específico, ao contrário do anticorpo monoclonal Leu6, que identifica o antígeno de superfície CD1a, mas requer cortes de tecido congelado.

NEOPLASIAS MESENQUIMAIS

Na forma macular do sarcoma de Kaposi, hemossiderina pode ser detectada através da técnica do azul-da-Prússia entre a proliferação de células fusiformes. No sarcoma de Kaposi nodular, um achado útil

para o diagnóstico é a identificação de glóbulos hialinos, PAS-positivos (corpúsculos de Kamino), nas células fusiformes, os quais representariam membranas degeneradas de eritrócitos fagocitados. A imunomarcção com anti-soro fator VIII também assinala a proliferação de espaços vasculares que formam agregados irregulares com freqüente comprometimento da derme adventícia perianexial.

O antígeno associado ao fator VIII também está presente em algumas, porém não em todas as células do angiossarcoma e, portanto, apresenta valor limitado em lesões pouco diferenciadas. Outro marcador de células endoteliais é representado pelo anticorpo monoclonal CD31 (Fig. 34-6).

A marcação imuno-histoquímica é, em geral, positiva para desmina e actina de músculo liso nos leiomiomas (Fig. 34-7)

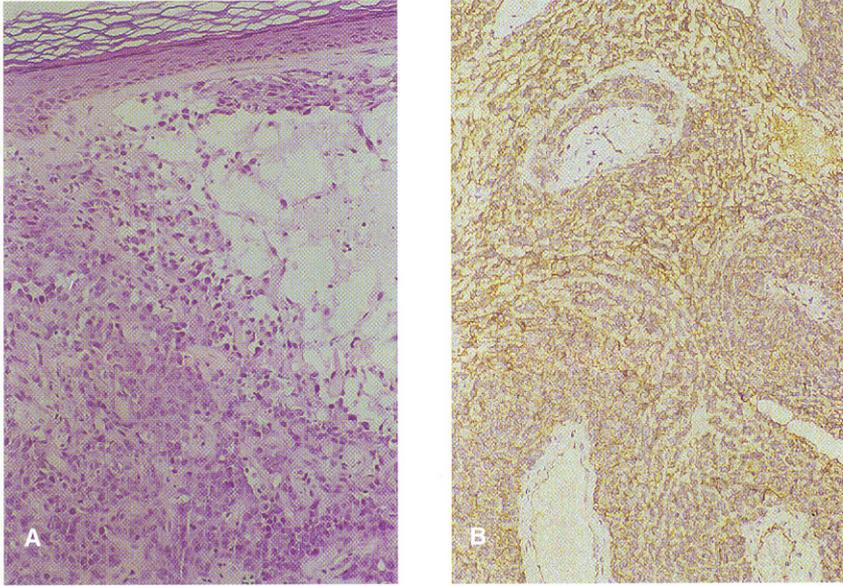


Fig. 34-6. Angiossarcoma - Infiltração dérmica por células neoplásicas que formam canais vasculares irregulares com empilhamento de suas células (A, H&E) cuja natureza endotelial é mais bem evidenciada pela reação positiva com o anticorpo monoclonal CD31 (B).

e leiomiossarcomas (Fig. 34-8) superficiais da pele. Estes diferenciam-se dos carcinomas indiferenciados de células fusiformes por serem negativos para as citoceratinas e expressarem a vimentina, filamento do citoesqueleto comum das neoplasias de origem mesenquimal.

No dermatofibrossarcoma protuberante a técnica da reticulina ressalta a configuração “estoriforme” e nos casos em que pequenos depósitos de pigmento melânico podem ser observados em algumas células neoplásicas (tumor de Bednar), causando confusão com melanomas de células fusiformes, técnicas imuno-histoquímicas têm grande utilidade ao mostrar que as células são negativas para pro-

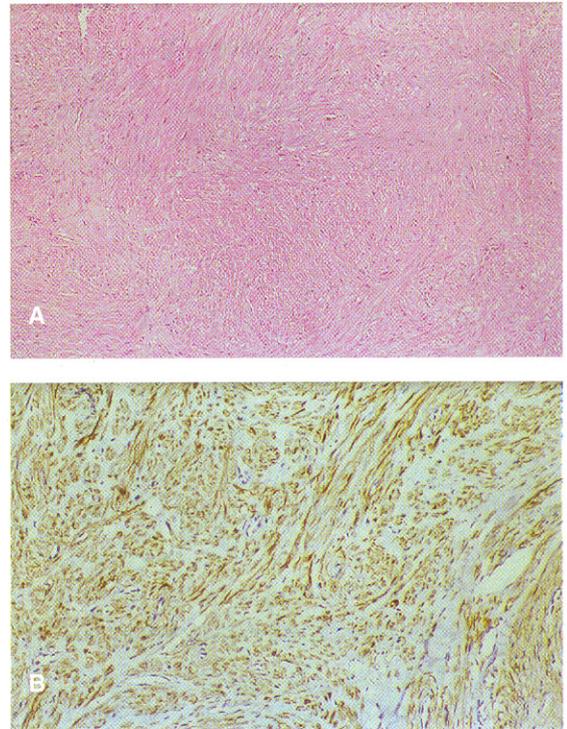


Fig. 34-7. Leiomioma - Feixes musculares lisos orientados em várias direções (A, H&E) com imunomarcagem difusa com anti-soro para actina de músculo liso (B).

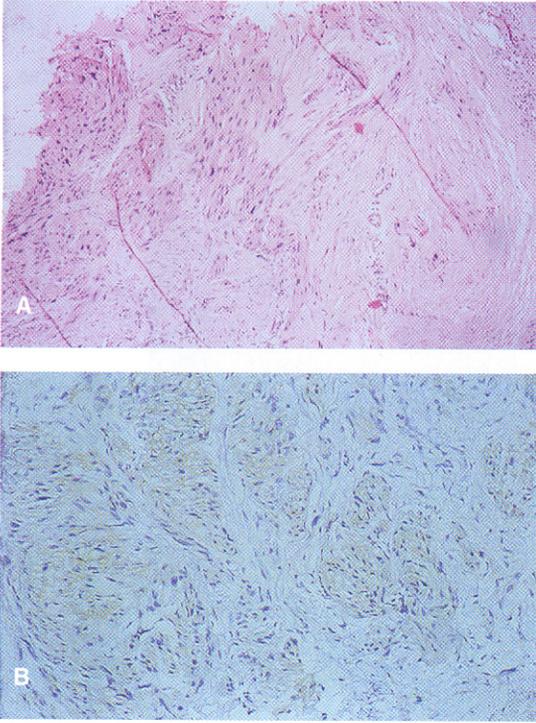


Fig. 34-8. Fascículos entrelaçados de células fusiformes, com citoplasma eosinofílico e núcleos alongados em forma de charuto compõem o quadro histopatológico do leiomiossarcoma cutâneo (A, H&E), cuja histogênese é confirmada por meio da reação positiva com anti-soro HHF-35 (B).

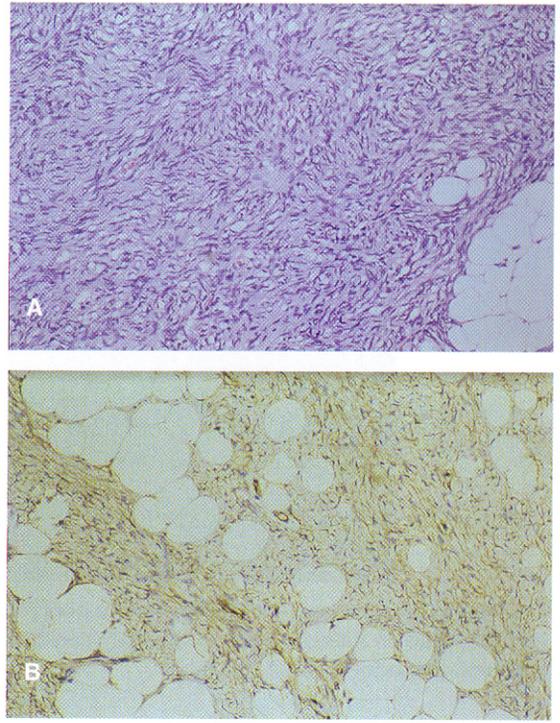


Fig. 34-9. O arranjo “estoriforme” das células neoplásicas e o característico padrão de infiltração do tecido adiposo são importantes para o diagnóstico do dermatofibrossarcoma protuberans (A, H&E), assim como a imunomarcação com o anti-soro CD34 (B).

teína S-100 e positivas para CD34 (Fig. 34-9).

O dermatofibroma é composto pela proliferação dos dendrócitos fator XIIIa+ (Fig. 34-10).

Melanomas e carcinomas espinocelulares de células fusiformes fazem parte do diagnóstico diferencial do fibroxantoma atípico que, contudo, apresenta positiv-

idade variável para alfa1-antiquimotripsina e é negativo para proteína S-100 e citoceratina. Por outro lado, alguns carcinomas indiferenciados podem exibir negatividade para citoceratinas de alto peso molecular e positividade para citoceratinas de baixo peso molecular, o que torna o emprego de um *pool* de citoceratinas de grande utilidade nesses casos (Fig. 34-11).

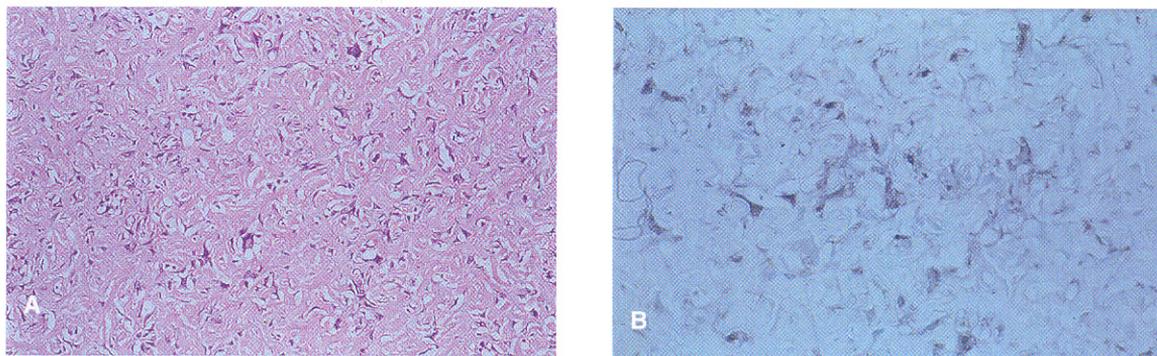


Fig. 34-10. Células de núcleos bizarros podem ser observadas em alguns dermatofibromas (A, H&E), e a imunorreatividade com anti-soro para o fator X13a é um importante auxiliar para o diagnóstico correto (B).

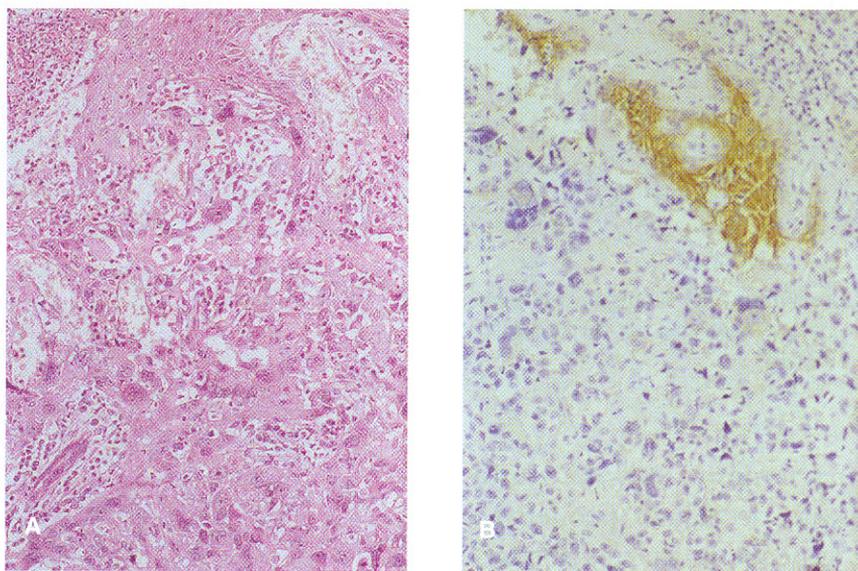


Fig. 34-11. O diagnóstico preciso de carcinomas indiferenciados (A, H&E) é facilitado pelo emprego de um *pool* de citoceratinas/AE1/AE3 (B).

NEOPLASIAS NEURAIAS

No tumor de células granulosas, o citoplasma finamente granular cora-se positivamente pelo PAS e apresenta reação imunohistoquímica variável com a proteína S-100, o que ajuda no diagnóstico diferencial.

O neurofibroma caracteriza-se igualmente pela expressão da proteína S-100 pelas células de Schwann (Fig. 34-12).

O carcinoma neuroendócrino da pele apresenta um padrão característico de imunomarcção com citoceratina que consiste em glóbulos paranucleares, redondos e discretos, assemelhando-se a inclusões, e pode exibir também imunorreatividade com cromogranina, indicador bastante específico de diferenciação neuroendócrina (Fig. 34-13). Esses achados são extremamente úteis para diferen-

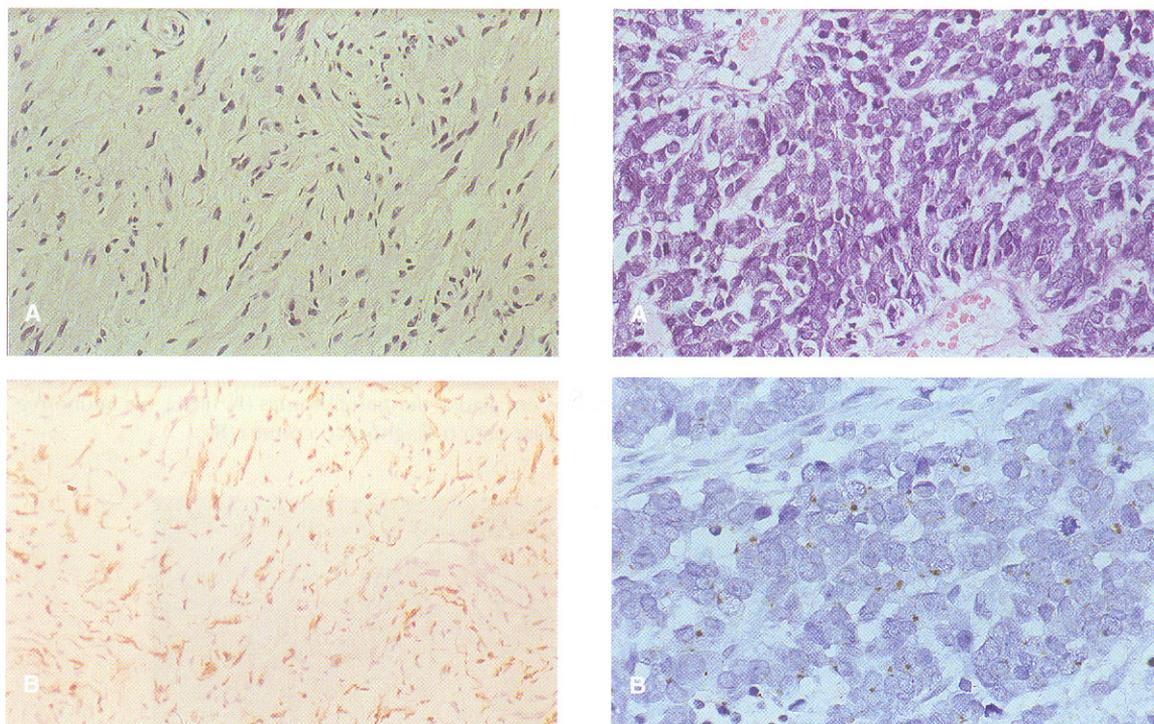


Fig. 34-12. O neurofibroma (A, H&E) é mais uma das neoplasias cutâneas que apresenta imunorreatividade com o anti-soro S-100 (B).

ciá-lo de outros tumores, tais como linfomas, melanomas de células pequenas e carcinomas de pequenas células metastáticos para a pele.

NEOPLASIAS METASTÁTICAS

A detecção de mucina em adenocarcinomas gastrintestinais metastáticos, que podem mimetizar melanoma ou doença de Paget extramamária ao exibir epidermotropismo das células em anel de sinete, requer o conhecimento de que é uma sialomucina PAS-positiva, resistente à

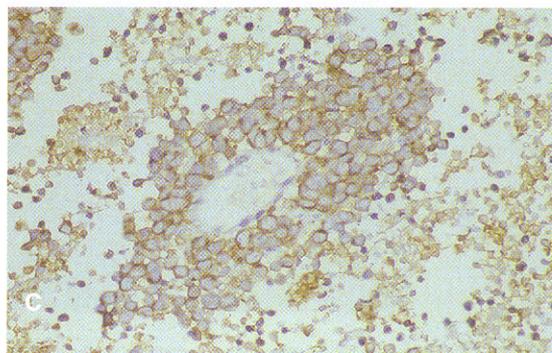


Fig. 34-13. O carcinoma neuroendócrino da pele tem diagnóstico histopatológico relativamente difícil (A, H&E), mas apresenta imunomarcagem característica em padrão globular paranuclear com citoceratina 20 (B) e tem sua natureza neuroendócrina confirmada na reação positiva com o anti-soro para cromogranina (C).

diastase; esta mucina cora-se pelo azul de Alcian em pH 2,5, mas não em pH 0,4, indicando sua natureza não-sulfatada, resistente à hialuronidase.

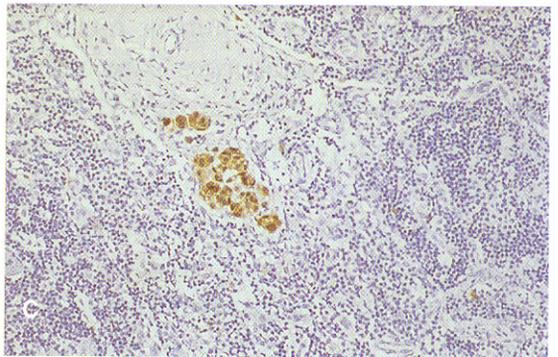
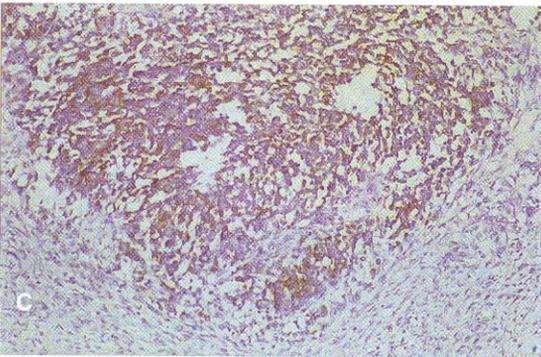
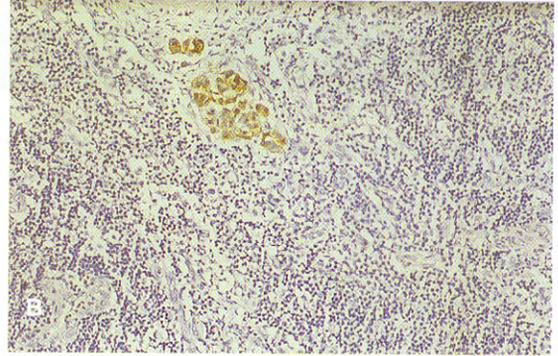
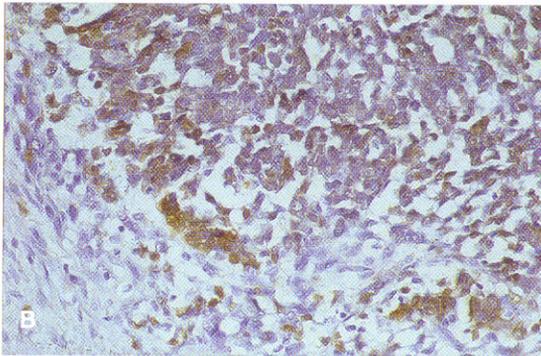
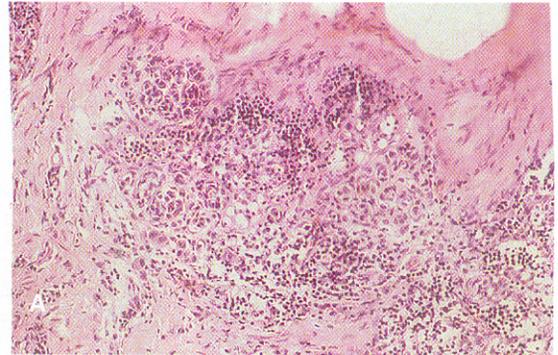
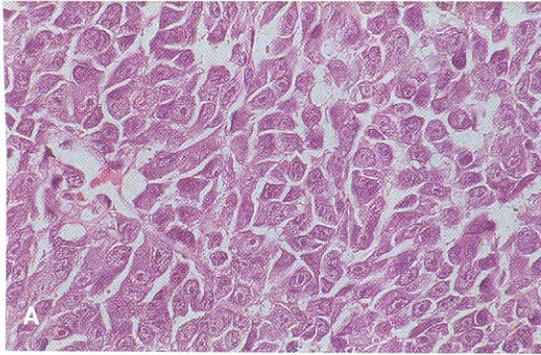


Fig. 34-14. Um melanoma amelanótico metastático para o seio nasal (A, H&E) pode ter seu diagnóstico confirmado empregando-se os anti-soros S100 (B) e HMB-45 (C).

Fig. 34-15. A investigação do comprometimento de gânglios sentinelas por melanoma (A, H&E) também é facilitada com a utilização da imunomarcção para HMB-45 (B) e S-100 (C).

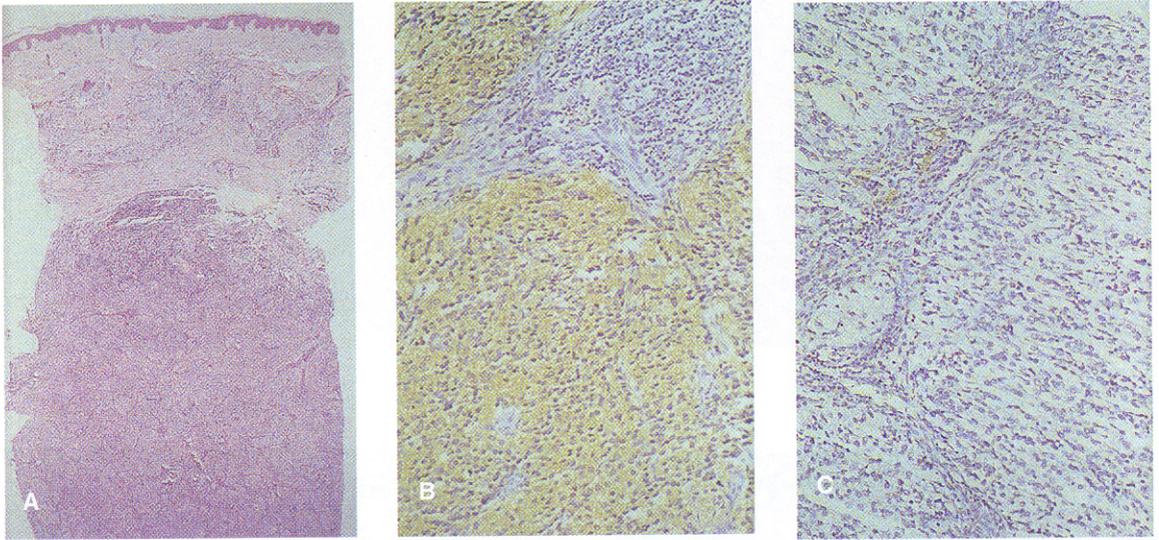


Fig. 34-16. Metástases cutâneas de neuroblastoma (A, H&E) têm seu diagnóstico confirmado ao apresentar imunorreatividade com o anti-soro para enolase neuronal específica (B) e ausência de reação nas células neoplásicas com o anti-soro S100 (C).

Em carcinomas de mama metastáticos com exuberante desmoplasia permeada por poucas células malignas, a detecção imuno-histoquímica de lúmens intracitoplasmáticos com anticorpos para antígeno de membrana epitelial (EMA) representa auxílio importante para caracterizar tais células como de um adenocarcinoma.

Metastases de carcinomas pulmonares, variantes de pequenas células, fazem diagnóstico diferencial com linfomas, mas não apresentam imunorreatividade com o antígeno comum leucocitário (LCA) e não revelam os agregados perinucleares de citoceratina, típicos dos carcinomas neuroendócrinos primários da pele.

As metastases de origem prostática em geral apresentam imunorreatividade para fosfatase ácida prostática, definindo sua histogênese.

Em melanomas amelanóticos metastáticos, a imunomarcagem com proteína S-100 e HMB-45 confirmará o diagnóstico (Fig. 34-14). O uso desses anticorpos auxilia, também, o exame do linfonodo sentinela em casos de melanoma (Fig. 34-15).

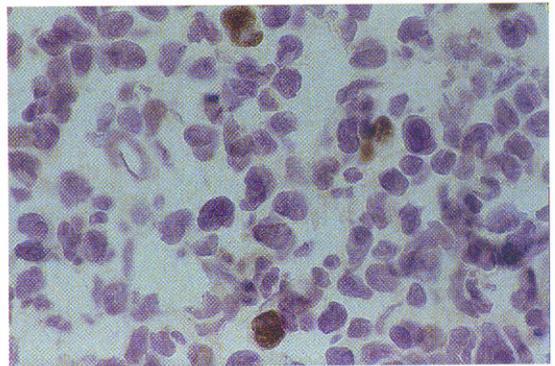


Fig. 34-17. Imunorreatividade em células de linfoma cutâneo com o marcador de proliferação celular Ki67.

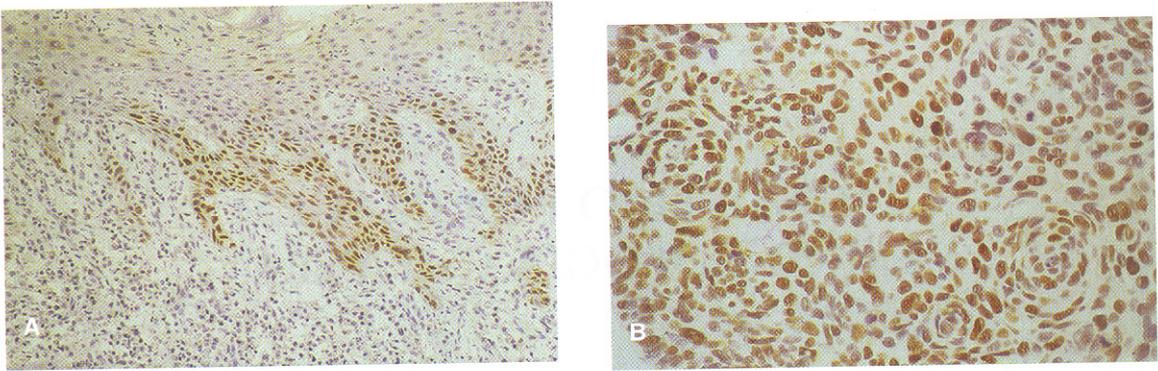


Fig. 34-18. Expressão da proteína p53 em queilite actínica (A) e epiteloma basocelular (B).

Metástases cutâneas de neuroblastoma (Fig. 34-16) na criança diferenciam-se de outras neoplasias malignas de células pequenas, particularmente da infiltração leucêmica da pele, por exibirem negatividade para o antígeno leucocitário comum e expressarem a enolase neuronal específica e mediadores neuronais, como a somatofisina. Diferenciam-se do melanoma amelanótico de células pequenas por exibirem negatividade para a proteína S-100.

MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As técnicas imuno-histoquímicas possibilitam, ainda, evidenciar marcadores de

proliferação celular, como o Ki67 (Fig. 34-17) e o PCNA, utilizados como índices prognósticos de neoplasias, particularmente as de natureza linfóide. A expressão da proteína p53 (Fig. 34-18) é também revelada por métodos imuno-histoquímicos e utilizada como um dos índices prognósticos de neoplasias.

BIBLIOGRAFIA

- Elias JM. *Principles and Techniques in Diagnostic Histopathology. Developments in Immunohistochemistry and Enzyme Histochemistry*. New Jersey, USA: Noyes Publications, 1982
- Mikel UV. (ed.) *Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology*. American Registry of Pathology, AFIP. Washington, DC, USA, 1994.