

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TELMA CARVALHO PEREIRA

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS SÍTIO-ESPECÍFICOS
PARA CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIO PRIMÁRIO DE CARCINOMAS
METASTÁTICOS**

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade
de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

Brasília

2011

TELMA CARVALHO PEREIRA

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS SÍTIO-ESPECÍFICOS
PARA CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIO PRIMÁRIO DE CARCINOMAS
METASTÁTICOS**

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade
de Brasília.**

Aprovada em 16 de maio de 2011

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães – (presidente)
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Florêncio Cavalcante Figueiredo Neto
Universidade Católica de Brasília**

**Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Nilce Santos de Melo
Universidade de Brasília**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, a qual devo tudo, e a Nossa Senhora, que com amor incansável de mãe constantemente me chama para seu Filho Jesus.

Em seguida agradeço ao meu querido marido, Fabricio Max Bueno Netto, pelos inúmeros fins-de-semana que passou comigo no departamento de patologia procurando lâminas e blocos nos arquivos, pela consultoria e suporte de informática, escolha, compra e manutenção de hardwares e softwares utilizados, e por ter incansavelmente cuidado de nossa filha, a querida Marian, durante tantas noites que passei no laboratório. Igualmente agradeço à Marian pelo amor, carinho, pela compreensão da diminuição das horas de convívio, e pela companhia durante longas horas de trabalho.

Agradeço aos meus pais Flora e Jeremias pelo amor, dedicação, carinho, exemplo, e apoio emocional, financeiro, logístico, e intelectual durante o doutorado e durante toda a minha vida. Agradeço à minha família por todo apoio e incentivo, em especial meus avós Benedito e Clóris, meu irmão Igor, e à Cirene, Maxine e Robson.

Devo agradecimentos especiais ao meu orientador, Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pelo acolhimento, exemplo de dedicação, seriedade e honestidade, ao meu querido mentor Dr. Jan F. Silverman, Chairman do Departamento de Patologia do Allegheny General Hospital, por ter me ensinado tanto sobre patologia e sobre pesquisa e por ter colaborado nesse trabalho com orientação, co-autoria, disponibilização de recursos, incentivo e exemplo. À Dra. Sarah M. Share, fellow do departamento na época da realização da pesquisa, pela enorme colaboração, co-autoria, ajuda e incentivo. Aos tecnólogos Bill e Terry que tanto me ajudaram com a técnica de microarray, ao Dr. Paik pela gentil permissão de uso de seu laboratório. À tecnóloga Ming Tung por todo o seu excelente e dedicado trabalho com a imunohistoquímica.

Agradeço especialmente ao Fundo de Pesquisa do Departamento de Patologia do Allegheny General Hospital de Pittsburgh, Pensilvânia, que financiou este projeto. Agradeço profundamente a todos que me ajudaram nesse trabalho: Patti Keenan pela grande ajuda com a pesquisa inicial de casos e seleção dos laudos, Kathy Streeter pela ajuda com os softwares, Courtney pela ajuda com a obtenção eletrônica de artigos, Janice pela ajuda com a impressão dos laudos, aos pacientes que participaram desse trabalho, ao Departamento de Patologia do Allegheny General Hospital, e a todos que colaboraram com a busca de lâminas e blocos: Élio, Scott Graner, voluntários júnior, Amy do departamento de voluntários. Agradeço também a Cláudia Cardoso, e à equipe da Ecocópia, em especial a Júnior, Rodrigo e Byanka. Agradeço aos funcionários da PGCS, especialmente Karla, Thaís e Edigrace. Agradeço à banca examinadora pela atenção dedicada à análise do meu estudo, que certamente exigiu-lhes distância de seu trabalho e família.

“Quanto a mim, que não me aconteça gloriar-me, a não ser na cruz de nosso Senhor Jesus Cristo, pela qual o mundo está crucificado para mim e eu para o mundo.”

(Gálatas 6,14)

RESUMO

Introdução: A diferenciação entre carcinoma primário e metastático e a determinação do sítio primário de uma metástase, de grande importância para o tratamento, frequentemente somente é possível somente com imuno-histoquímica. Recentemente surgiram marcadores específicos para um órgão ou alguns órgãos, por isso é necessária sua validação em amostra grande e diversificada.

Objetivo: Elaborar um painel imuno-histoquímico de marcadores sítio-específicos para análise de carcinomas metastáticos.

Método: Estudo de 904 carcinomas de diferentes órgãos e tipos histológicos, com *microarray* de tecido, utilizando 24 anticorpos: CDX-2, CK5/6, GCDFP-15, Hep-Par1, Mammaglobin, Napsin A, PAP, Pax-2, PSA, RCC, Receptor de estrogênio, Receptor de progesterona, Tireoglobulina, TTF-1, Uroplakin, Villin, WT-1, CK7, CK20, K903, p16, p63, AE1/AE3 e Cam5.2.

Resultados: AE1/AE3 teve excelente positividade (83-100%) em quase todos os carcinomas. Cam5.2 teve boa positividade nos não-escamosos (80-100%). K903 foi positivo em 100% dos carcinomas escamosos. p63 foi positivo em 100% dos carcinomas escamosos, e 83% dos carcinomas uroteliais. Tireoglobulina foi positiva em 95% dos carcinomas de tireóide. PSA e PAP foram positivo respectivamente em 97% e 95% dos carcinomas de próstata. TTF-1 foi positivo em 93% de tireóide, e em 77% dos carcinoma pulmonares não-escamosos. Napsin A foi positivo em 26% dos carcinomas pulmonares escamosos, e 59% dos carcinomas pulmonares não-escamosos. CDX-2 e villin foram positivos respectivamente em 95% e 94% dos carcinomas cólon-retais, e 36% e 64% dos adenocarcinomas de estômago e 52% e 76% dos adenocarcinomas de esôfago e junção esôfago-gástrica. Para carcinoma renais, Pax-2 foi positivo em 65% e RCC em 56% dos tumores. Hep-Par1 foi positivo em 92% dos carcinomas hepatocelulares. Mammaglobin teve positividade de 61% nos carcinomas mamários. GCDFP-15 teve 67% de positividade em mama. A positividade para os receptores de estrogênio e progesterona foram, respectivamente, 89% e 63% para mama, 80% e 97% para endométrio, e 84% e

86% para ovário. WT1 foi positivo em 59% dos carcinomas de ovário. CK7 teve positividade variável em vários órgãos. CK20 foi positivo em 94% dos carcinomas cólon-retais, 49% dos uroteliais, 38% dos colangiocarcinomas, 21% dos adenocarcinomas de estômago, 21% dos adenocarcinomas de esôfago e junção esôfago-gástrica, 11% dos carcinomas de pâncreas, e 43% carcinomas mucinosos de ovário. p16 foi negativo em todos os carcinomas escamosos pulmonares e foi positivo em 24-45% dos outros tumores escamosos. Uroplakin III foi positivo em 87% dos carcinomas uroteliais. CK5/6 foi positivo em 60% dos carcinomas uroteliais, e em quase 100% dos carcinomas escamosos.

Conclusões: Para carcinomas escamosos a maioria dos marcadores não contribui para determinar o sítio primário. Positividade para TTF-1 e/ou Napsin A favorece pulmão, enquanto para p16 favorece outros sítios (cabeça e pescoço, esôfago, anogenital). Para carcinoma não-escamosos metastáticos de sítio primário desconhecido o painel recomendado é: TTF-1, CDX-2, Villin, Pax-2, RCC, Uroplakin III, CK5/6, Hep-Par1, Tireoglobulina, CK7, CK20, além de PSA se paciente do sexo masculino e receptor de estrogênio, receptor de progesterona, WT-1, e GCDFP-15 se paciente do sexo feminino. Para tumores indiferenciados recomenda-se confirmar diferenciação epitelial com AE1/AE3 e Cam5.2; p63 para procurar diferenciação escamosa, e o painel de carcinomas não-escamosos.

Palavras chave: Carcinoma; metastático; imuno-histoquímica; sítio-específico; microarray de tecido.

ABSTRACT

Introduction: The very important distinction between primary and metastatic carcinoma and the identification of the primary site of a metastasis are often not possible with histopathology alone, and immunohistochemistry is necessary. Recently, markers specific to an organ or a small number of organs have been described, but validation with a large and diverse sample is necessary.

Objective: To develop an immunohistochemical panel of site-specific markers to the work-up of metastatic carcinomas.

Method: We studied 904 carcinomas of different organs and histologic types, using tissue microarray, and 24 antibodies: CDX-2, CK5/6, Estrogen receptor, GCDFP-15, Hep-Par1, Mammaglobin, Napsin A, PAP, Pax-2, Progesterone receptor, PSA, RCC, Thyroglobulin, TTF-1, Uroplakin, Villin, WT-1, CK7, CK20, K903, p16, p63, AE1/AE3 and Cam5.2.

Results: AE1/AE3 had excellent positivity (83-100%) in almost all carcinomas. Cam5.2 had good positivity in the non-squamous carcinomas (80-100%). K903 was positive in 100% of squamous carcinomas. p63 was positive in 100% of squamous carcinomas, and 83% of urothelial carcinomas. Thyroglobulin was positive in 95% of thyroid carcinomas. PSA and PAP were positive in 97% and 95% of prostate carcinomas, respectively. TTF-1 was positive in 93% of thyroid carcinomas, and 77% of pulmonary non-squamous carcinomas. Napsin A was positive in 26% of pulmonary squamous carcinomas, and 59% of pulmonary non-squamous carcinomas. CDX-2 and villin were positive respectively in 95% and 94% of colorectal carcinomas, in 36% and 64% of gastric adenocarcinomas, and in 52% and 76% of adenocarcinomas of esophagus and gastro-esophageal junction. In renal carcinomas, Pax-2 was positive in 65% and RCC in 56% of tumors. Hep-Par1 was positive in 92% of hepatocellular carcinomas. Mammaglobin had 61% positivity in breast carcinomas. GCDFP-15 had 67% positivity in breast carcinomas. The positivity of estrogen and progesterone receptors were, respectively, 89% and 63% in breast, 80% and 97% in endometrium, and 84% and 86% in ovary. WT1 was positive

in 59% of ovary carcinomas. CK7 had variable positivity in several organs. CK20 was positive in 94% of colorectal carcinomas, 49% of urothelial carcinomas, 38% of cholangiocarcinomas, 21% of adenocarcinomas of esophagus, 21% of adenocarcinomas of stomach, 11% of pancreatic adenocarcinomas, and 43% of mucinous carcinomas of ovary. p16 was negative in all pulmonary squamous carcinomas and was positive in 24-45% of other squamous carcinomas. Uroplakin III was positive in 87% of urothelial carcinomas. CK5/6 was positive in 60% of urothelial carcinomas, and almost 100% of squamous carcinomas.

Conclusions: Regarding squamous carcinomas the majority of markers was non-contributory to determine the primary site. Positivity to TTF-1 and/or Napsin A favors lung, while positivity to p16 favors other sites (head and neck, esophagus, anogenital). For metastatic non-squamous carcinomas of unknown primary site the recommended panel is: TTF-1, CDX-2, Villin, Pax-2, RCC, Uroplakin III, CK5/6, Hep-Par1, Thyroglobulin, CK7, CK20, and also PSA for males or estrogen receptor, progesterone receptor, WT-1, and GCDFP-15 for females. For undifferentiated tumors it is recommended to confirm epithelial differentiation with AE1/AE3 and Cam5.2; to look for squamous differentiation with p63, and use the above panel for non-squamous carcinoma.

Keywords: Carcinoma; metastatic; immunohistochemistry; site-specific; tissue microarray.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo de “mapa” da localização dos carcinomas em um bloco de <i>microarray</i>	39
Figura 2. A: Bloco de <i>microarray</i> . B: Lâmina cortada de bloco de <i>microarray</i> e corada com HE.....	39
Figura 3: Exemplo de caso excluído (seta) porque o “círculo” de tecido se desprende da lâmina durante o processamento.	41
Figura 4: Exemplo de caso interpretado como negativo. Glândulas de adenocarcinoma são claramente visíveis, em azul (negativo).	42
Figura 5: Exemplos de diferentes tipos de expressão: A: Expressão nuclear de receptor de estrogênio, fortemente positivo em carcinoma ductal de mama, B: Expressão nuclear de receptor de estrogênio, intensidade fraca porém positivo em adenocarcinoma de pulmão, C: Expressão citoplasmática de CK7 em carcinoma escamoso, D: Expressão granular citoplasmática de Napsin A em adenocarcinoma de pulmão, E: Expressão nuclear e citoplasmática de p16 em carcinoma escamoso, F: Expressão membranosa de villin em adenocarcinoma de cólon.....	43
Figura 6. Imuno-histoquímica positiva (citoplasmática) em carcinoma ductal de mama para mammaglobin (A) e GCDFP-15 (B).....	49
Figura 7. Imuno-histoquímica positiva para Pax-2 (nuclear) em carcinoma de células renais do tipo células claras.	53
Figura 8. Imuno-histoquímica positiva em adenocarcinoma de pulmão A: TTF-1. (nuclear) B : Napsin A (granular citoplasmática)	58
Figura 9. Imuno-histoquímica positiva para villin (membranosa) em adenocarcinoma de estômago.....	61
Figura 10. Imuno-histoquímica positiva (nuclear) em carcinoma de ovário para WT1 (A) e em carcinoma lobular de mama para receptor de estrogênio (B).....	61
Figura 11. Imuno-histoquímica positiva para AE1/AE3 em carcinoma escamoso.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos diversos anticorpos utilizados no estudo incluindo especificação dos respectivos clones, identificação dos fabricantes de cada um deles, graus de diluição, tipos de recuperação antigênica e sistemas de automação utilizados	40
Tabela 2 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CDX-2 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	45
Tabela 3 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CK5/6 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	46
Tabela 4 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo GCDFP-15 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	47
Tabela 5 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo HepPar-1 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	48
Tabela 6 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Mammaglobin em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	49
Tabela 7 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Napsin A em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	50
Tabela 8 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo PAP em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	51
Tabela 9 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo PSA em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	52
Tabela 10 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Pax-2 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	53
Tabela 11 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo RCC em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	54

Tabela 12 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo ER (Receptor de estrogênio) em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	55
Tabela 13 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo PR (Receptor de progesterona) em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	56
Tabela 14 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Tireoglobulina em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	57
Tabela 15 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo TTF-1 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	58
Tabela 16 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Uroplakin III em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	59
Tabela 17 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Villin em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	60
Tabela 18 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo WT-1 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	62
Tabela 19 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CK7 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	63
Tabela 20 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CK20 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	64
Tabela 21 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo K903 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	65
Tabela 22 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo p16 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	66
Tabela 23 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo p63 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	67

Tabela 24 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo AE1/AE3 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	68
Tabela 25 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Cam5.2 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de <i>Tissue microarray</i>	69
Tabela 26 - Distribuição de percentagens de casos positivos dos resultados imuno-histoquímicos obtidos com a utilização de todos os 24 anticorpos avaliados neste estudo em carcinomas primários de diferentes órgãos com o método de <i>Tissue microarray</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

CK: Citoqueratina

CK5/6: Citoqueratina 5 / Citoqueratina 6

CK7: Citoqueratina 7

CK20: Citoqueratina 20

ER: *Estrogen receptor* (Receptor de estrogênio)

GCDFP-15: *Gross Cystic Disease Fluid Protein-15* (Proteína do Fluido de Doença Cística Macroscópica -15)

HE: Hematoxilina-eosina

HepPar-1: *Hepatocyte paraffin1* (Hepatócito parafina 1)

HMW: *High molecular weight keratins* (Citoqueratinas de alto peso molecular)

HPV: *Human Papilloma Virus* (Vírus do Papiloma Humano)

JEG: Junção esôfago-gástrica

K903: Queratina 903

kDa: Kilodalton

LMW: *Low molecular weight keratins* (Citoqueratinas de baixo peso molecular)

PAP: *Prostatic Acid Phosphatase* (Fosfatase Ácida Prostática)

Pax-2: *Paired box gene 2*

PEN: *Pancreatic Endocrine Neoplasia* (Neoplasia Endócrina Pancreática)

PR: *Progesterone receptor* (Receptor de progesterona)

PSA: *Prostate Specific Antigen* (Antígeno Específico da Próstata)

Rb: Gene do retinoblastoma

RCC: *Renal Cell Carcinoma Antigen* (Antígeno de Carcinoma de Células Renais)

SSTMA: *Site-specific tissue microarray* (Microarray de tecido sítio-específico)

TTF-1: *Thyroid Transcription Factor 1* (Fator de Transcrição Tireoidiano 1)

WT1: *Wilm's Tumor Protein 1* (Proteína do Tumor de Wilms 1)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 CDX-2	19
2.2 CK5/6 (CITOQUERATINA 5 / CITOQUERATINA 6).....	20
2.3 GCDFP-15	21
2.4 HEPPAR-1	21
2.5 MAMMAGLOBIN.....	22
2.6 NAPSIN A.....	22
2.7 PAP E PSA	23
2.8 PAX-2.....	23
2.9 RCC.....	23
2.10 RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E RECEPTOR DE PROGESTERONA.....	24
2.11 TIREOGLOBULINA.....	25
2.12 TTF-1	25
2.13 UROPLAKIN III	25
2.14 VILLIN.....	26
2.15 WT-1	27
2.16 CITOQUERATINA 7 (CK7):	27
2.17 CITOQUERATINA 20 (CK20).....	28
2.18 K903.....	29
2.19 p16	29
2.20 p63	29
2.21 AE1/AE3.....	30
2.22 CAM5.2.....	30
2.23 TÉCNICA DE <i>MICROARRAY</i>	31

3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 OBJETIVOS	33
5 MÉTODOS.....	34
6 RESULTADOS.....	44
7 DISCUSSÃO	71
8 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICE A - TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	102
TRABALHO 1: “A Tissue Microarray Immunohistochemical Study of Gynecologic Versus Breast Primary.”.....	102
TRABALHO 2: “PAX-2 and Napsin A in the Differential Diagnosis of Lung Versus Kidney Primary Site in Patients with Renal Cell Carcinoma and a New Lung Mass: A Comparison with TTF-1 and RCC Antigen”	103
TRABALHO 3: “The Value of PAX-2 for the Work-Up of Metastatic Carcinoma of Unknown Primary: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study of 694 Cases”	105
TRABALHO 4: “Can We Tell the Site of Origin of Metastatic Squamous Cell Carcinoma? An Immunohistochemical Tissue Microarray Study of 194 Cases”...	106
TRABALHO 5: “The Value of Villin for the Work-up of Colonic Carcinoma: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study of 378 Cases.”	107
TRABALHO 6: “The Utility of Napsin A and Mammaglobin in the Differential Diagnosis of Metastatic Adenocarcinoma of the Breast Versus a Lung Primary.”	108
APÊNDICE B - TRABALHO PUBLICADO EM REVISTA CIENTÍFICA.....	110
“CAN WE TELL THE SITE OF ORIGIN OF METASTATIC SQUAMOUS CELL CARCINOMA? AN IMMUNOHISTOCHEMICAL TISSUE MICROARRAY STUDY OF 194 CASES”.....	110
ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	111

1 INTRODUÇÃO

No Brasil as neoplasias malignas correspondem à segunda causa de morte, sendo estimados (no ano de 2010) 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 casos novos para o sexo feminino. (1) Com o advento de métodos terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos, os índices de sobrevida estão aumentando, de forma que o câncer fará parte das doenças crônicas comumente encontradas com o avançar da idade, à semelhança de diabetes e hipertensão arterial sistêmica. (2)

À medida que pacientes com câncer têm uma sobrevida aumentada, a prevalência de doença metastática também tende a aumentar. Quando um paciente com história pregressa de câncer apresenta nova neoplasia, em sítios que comumente abrigam metástases (tais como pulmão e fígado), é comum a dúvida se esta lesão é uma metástase ou novo tumor primário. A diferença para o tratamento é fundamental, já que a maioria dos tumores primários tem indicação cirúrgica e o tratamento de metástases envolve terapia sistêmica (quimioterapia e radioterapia).

Outras questões relativamente comuns são pacientes que têm história de mais de um câncer primário, e pacientes em que a metástase é a apresentação inicial da doença (por exemplo, metástase para linfonodos ou para cavidades pleural ou peritoneal). A descoberta do sítio primário pode ter implicações importantes para a terapia sistêmica (por exemplo, se o sítio primário for câncer de mama, o tratamento hormonal pode ser indicado). O papel do patologista no diagnóstico desses pacientes é, além de estabelecer a presença de metástase, cada vez mais também determinar qual o sítio primário. (3) Embora a histopatologia possa sugerir o sítio primário em alguns casos pelas características celulares típicas (como por exemplo, um adenocarcinoma com células alongadas, em forma de “lápiz”, associado com necrose e com grande quantidade de debris nucleares e neutrófilos, que são características clássicas de adenocarcinoma de cólon), na maioria dos casos não há certeza quanto ao sítio primário pela histopatologia somente.

Metástase de sítio primário desconhecido representa aproximadamente 2 a 5% de todos as neoplasias malignas. (4) Esses pacientes apresentam doença metastática em que o sítio primário não é evidenciado no momento do diagnóstico.

Vários exames complementares incluindo os de imagem (tomografia computadorizada, mamografia, tomografia por emissão de pósitrons) e os laboratoriais (imuno-histoquímica, microscopia eletrônica e patologia molecular) são utilizados, mas em muitos casos o sítio primário permanece desconhecido mesmo após a autópsia do paciente. (4)

A determinação do sítio primário é de grande importância para o seu tratamento. Até recentemente, metástases de sítio primário desconhecido eram tratadas com quimioterapia de amplo espectro. Entretanto, a crescente disponibilidade de tratamentos direcionados a tipos específicos de câncer trouxe uma demanda para um diagnóstico mais preciso do seu sítio primário. (5)

Nas últimas décadas, a patologia cirúrgica teve um avanço muito grande devido à disponibilidade de realização de imuno-histoquímica em material fixado em formol, que é a forma como os casos são rotineiramente conservados. Inicialmente, existia um pequeno número de marcadores que possibilitava apenas a determinação da linhagem geral de um tumor (por exemplo, carcinoma, linfoma, sarcoma ou melanoma). Progressivamente, foram sendo desenvolvidos novos marcadores que possibilitam diagnósticos mais específicos dentro de cada linhagem geral, e, também, marcadores que determinam o prognóstico ou que determinam a resposta à determinada terapia (os chamados “marcadores preditivos”). Alguns marcadores diagnósticos também têm valor prognóstico e preditivo (por exemplo, receptores de estrogênio e progesterona, em câncer de mama). (6-10)

A grande maioria dos casos de câncer em adultos é de origem epitelial, ou seja, carcinomas. (3, 11) .O uso de imuno-histoquímica para determinação de sítio primário de carcinomas metastáticos vem crescendo cada vez mais. Entretanto, a maioria dos marcadores disponíveis apresenta reatividade cruzada em vários tipos diferentes de carcinoma, de forma que um painel de vários marcadores é necessário, e a determinação do sítio primário é geralmente feita sob a forma de uma lista de sítios mais prováveis. (3, 12)

Recentemente, marcadores com especificidade restrita a carcinoma de um órgão, ou a um número reduzido de órgãos, vêm sendo descritos, com possibilidades para uma determinação de sítio primário mais precisa do tumor metastático que está sendo estudado. (13, 14)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da literatura em inglês pelo Medline (Ovid) revelou enorme número de artigos pertinentes à imuno-histoquímica de carcinoma. Vinte e quatro marcadores imuno-histoquímicos foram escolhidos para o presente estudo. Dentre esses vinte e quatro marcadores, dezessete foram escolhidos por serem, de certa forma, específicos para um determinado sítio ou para um número limitado de sítios, (em ordem alfabética): CDX-2, CK5/6, GCDFP-15, Hep-Par1, Mammaglobin, Napsin A, PAP, Pax-2, PSA, RCC, Receptor de estrogênio, Receptor de progesterona, Tiroglobulina, TTF-1, Uroplakin, Villin, e WT-1.

Os outros sete marcadores consistem nas citoqueratinas CK7 e CK20, K903, p16, p63, AE1/AE3, e Cam5.2

As citoqueratinas CK7 e CK20 são úteis no estudo de carcinomas metastáticos por enquadrar os carcinomas em um dos quatro grupos estabelecidos: positivo para as duas, negativo para as duas, positivo para CK7 e negativo para CK20, e negativo para CK7 e positivo para CK20. (15-17)

K903, p16, e p63 foram incluídos para auxiliar na diferenciação do sítio primário dos carcinomas escamosos.

AE1/AE3 e Cam5.2 são marcadores gerais de carcinomas que foram incluídos para completar o estudo, e serviram também como controles positivos internos da técnica.

Abaixo segue uma breve revisão bibliográfica sobre cada um dos vinte e quatro marcadores, seguindo a ordem acima utilizada, finalizada por uma revisão sobre a técnica de microarray.

2.1 CDX-2

CDX-2 é um gene de homeobox que codifica um fator de transcrição que guia o desenvolvimento do epitélio intestinal desde o duodeno até o reto. O anticorpo

contra CDX-2 tem expressão nuclear e é sensível e específico para carcinomas de cólon e reto, mas também há expressão de CDX-2 em outros adenocarcinomas do trato gastrointestinal (estômago, duodeno, esôfago, pâncreas, trato biliar) e tumores mucinosos de ovário. Alguns carcinomas mucinosos do pulmão com características intestinais (os chamados “colóide”) podem, também, ser positivos para CDX-2. (18, 19)

CDX2 também já foi descrito como positivo em alguns adenocarcinomas da cérvix uterina, e raramente em carcinomas de próstata ou de tireóide. (19, 20)

2.2 CK5/6 (CITOQUERATINA 5 / CITOQUERATINA 6)

Citoqueratinas constituem uma família de filamentos intermediários intracitoplasmáticos presentes em quase todos os epitélios. A expressão de cada molécula de citoqueratina depende do tipo da célula e do estado de sua diferenciação, de forma que algumas citoqueratinas específicas podem ser usadas como marcadores para identificar tipos específicos de carcinomas.

As citoqueratinas são classificadas com os números 1 a 20, e estão denominadas com a sigla CK (do inglês *cytokeratin*), seguida do respectivo número: CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7, CK8, CK9, CK10, CK11, CK12, CK13, CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK20. Podem ser básicas (tipo II) ou ácidas (tipo I). As citoqueratinas tipo II (básicas) compreendem as citoqueratinas de número CK1 a CK8 e as citoqueratinas tipo I (ácidas) compreendem as citoqueratinas de número CK9 a CK20. Dentro de cada tipo, as citoqueratinas estão numeradas, consecutivamente, em ordem decrescente de seu peso molecular, de forma que dentre as citoqueratinas básicas a de maior peso molecular é a CK1, e o seu peso molecular vai decrescendo até a CK8. Dentre as citoqueratinas ácidas a de maior peso molecular é a CK9, e este vai decrescendo até chegar à CK20.

As citoqueratinas de alto peso molecular (HMW= *high molecular weight keratins*) são observadas em epitélio estratificado e geralmente não estão presentes em epitélio visceral simples. As citoqueratinas de alto peso molecular são comumente vistas em epitélio derivado de ductos (mama, pâncreas, trato biliar, pulmão), e em urotélio, ovário, tecido mesotelial, e epitélio escamoso. (21-23) Já as

citoqueratinas de baixo peso molecular (LMW = *low molecular weight keratins*) são encontradas em quase todo tipo de epitélio, porém não são encontradas em epitélio escamoso. (24)

CK5 e CK6 (citoqueratina 5 e citoqueratina 6) são citoqueratinas básicas (tipo II) com peso molecular de 58kDa e 56kDa, respectivamente. A maioria dos estudos foram realizados usando anticorpos contra CK5/6, ela tem expressão citoplasmática e é expressa tanto no mesotélio benigno quanto no neoplásico (sendo muito útil no seu diagnóstico diferencial com adenocarcinomas, em biópsias pleurais e citologia de líquido pleural e peritoneal). (25)

No diagnóstico diferencial de metástases, o anticorpo para CK5/6 é útil como marcador de carcinomas uroteliais. É importante frisar que CK5/6 também marca carcinomas escamosos, independente do sítio de origem, e já foi relatado em uma porcentagem de adenocarcinomas de endométrio, pâncreas, e mama e ovário. (26-29)

2.3 GCDFP-15

GCDFP-15 [*Gross Cystic Disease Fluid Protein-15* (Proteína do Fluido de Doença Cística Macroscópica -15)] é encontrada em abundância em fluido de cistos de mama e em qualquer célula que tenha características apócrinas, como estruturas acinares nas glândulas salivares, glândulas apócrinas, glândulas sudoríparas, doença de Paget da pele, vulva e próstata. Tem expressão citoplasmática, e é muito específica para carcinoma de mama, porém sua sensibilidade é baixa. (30-34)

2.4 HEPPAR-1

HepPar-1 [*Hepatocyte paraffin1* (Hepatócito parafina 1)] é o marcador mais específico e sensível de diferenciação para hepatócitos em tecido incluído em parafina. É um anticorpo direcionado contra um antígeno mitocondrial presente nos

hepatócitos, e tem coloração citoplasmática. HepPar-1 é 79% específico para diferenciação hepática, e tem alta sensibilidade. (35-37)

Entretanto, assim como outros marcadores chamados "sítio-específicos", ele também é positivo em um número limitado de outros tumores. (38-40)

Carcinomas de ovário e estômago com aparência "hepatóide" também podem expressar HepPar-1. (41)(42)

2.5 MAMMAGLOBIN

O gene da mammaglobin codifica uma proteína de 93 aminoácidos que é principalmente confinada a tecido mamário. Han et al. (43) desenvolveram anticorpos contra mammaglobin e encontraram alta sensibilidade (84,3%) e especificidade (85%) para a discriminação de carcinoma de mama, em linfonodos. A expressão é citoplasmática. Mammaglobin também é expressa em carcinomas endometrióides, de glândulas salivares e de glândulas sudoríparas. Porém imunorreatividade fraca com mammaglobin pode ser encontrada em vários carcinomas que não o de mama. (43-52)

2.6 NAPSIN A

Napsin A é uma protease envolvida na maturação da proteína B surfactante, e é expressa no citoplasma de células do pulmão e do rim. (53-55) A imuno-histoquímica é considerada positiva quando há marcação granular no citoplasma. (55) Recentes relatos usando imuno-histoquímica revelaram que Napsin A tem altas sensibilidade e especificidade para adenocarcinoma pulmonar, (54, 56, 57) porém também pode ser positivo em carcinomas do rim e da tireóide (58) e de outros órgãos, com expressão baixa e diferente do padrão granular. (59)

2.7 PAP E PSA

Os anticorpos contra PAP [*Prostatic Acid Phosphatase* (Fosfatase Ácida Prostática)] e PSA [*Prostate Specific Antigen* (Antígeno Específico da Próstata)] marcam, em conjunto, mais de 95% dos casos de carcinomas da próstata com expressão citoplasmática. Porém, quanto maior for o grau do tumor na classificação de Gleason, menor é o número de células tumorais que são marcadas; e PAP é encontrado em uma grande variedade de outros tumores incluindo carcinóides do trato gastrointestinal. (60) PSA foi relatado focalmente em alguns carcinomas ductais de glândula salivar, e em até um terço dos carcinomas de mama e glândulas sudoríparas. (61) Porém, PSA é altamente específico para tecido prostático porque funciona como uma protease de serina do sêmen. (62, 63) Carcinoma de próstata metastático pode ser positivo em graus variados em sítios metastáticos, incluindo linfonodos. (64) A imunorreatividade não diminui com leve descalcificação.

PSA foi relatado ser positivo em raras células tumorais de melanoma cutâneo e em suas metástases, porém essa dificuldade diagnóstica pode ser solucionada facilmente com a inclusão de citoqueratinas no painel de anticorpos. (65)

2.8 PAX-2

A expressão de Pax-2 (*paired box gene 2*) é necessária para o desenvolvimento normal do rim. Os estudos imuno-histoquímicos com Pax-2 em tumores humanos são até agora limitados, e a expressão de Pax-2 (que é nuclear) é vista principalmente em tumores renais e ovarianos. (66-72)

2.9 RCC

O antígeno RCC [*Renal Cell Carcinoma* (Carcinoma de Células Renais)] é uma glicoproteína de 200kDa, conhecida como gp200 e que se encontra presente na

superfície e no citoplasma de vários tecidos normais incluindo a borda vilosa dos túbulos proximais renais, a superfície dos ácinos mamários, epidídimo, paratireóide, e tecido tireoidiano. O anticorpo contra RCC tem expressão citoplasmática.

McGregor et al. (73) estudaram RCC em vários tumores não-renais e encontraram positividade em 29% dos tumores de mama, 28% dos carcinomas embrionários, e em todos os adenomas de paratireóides. Oitenta por cento dos carcinomas renais primários foram positivos para este marcador (células claras 84%, papilar 96%, cromóforo 45%, sarcomatóide 25% e do ducto coletor 0%). Nenhum outro tumor primário renal foi positivo, incluindo oncocitomas. Somente 67% dos carcinomas renais metastáticos foram positivos com RCC. Somente 2% das metástases não-renais foram positivas com RCC (principalmente carcinomas metastáticos de mama). Bakshi et al. (74) recentemente demonstraram que RCC pode não ser um marcador específico porque 76 de 362 amostras de tumor não-renal demonstraram expressão focal ou difusa com RCC. Esses tumores incluíram neoplasias do córtex supra-renal (37/170; 22%), cólon (11/29; 37,5%), mama (9/27; 33%), próstata (5/18; 27,7%), ovário (2/17; 11,7%), melanoma (3/18; 16,6%), pulmão (3/21; 14,2%), e paratireóide (3/3; 100%). RCC tem especificidade moderada e sensibilidade relativamente baixa para carcinoma de células renais.

2.10 RECEPTOR DE ESTROGÊNIO e RECEPTOR DE PROGESTERONA

A análise imuno-histoquímica para receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) tem importância prognóstica e terapêutica, definitivamente estabelecida no carcinoma primário de mama, sendo usada de rotina com este objetivo. (10) Além desse uso, imuno-histoquímica para ER e PR também tem grande utilidade para determinação de sítio primário de metástases, sendo usado como marcadores para carcinoma de mama, útero e ovário. (6, 10, 15, 75-78) Sua expressão é nuclear.

Positividade já foi relatada em carcinomas de outros sítios (como pulmão, estômago) principalmente para receptor de estrogênio, e raramente para receptor de progesterona. (6, 79)

2.11 TIREOGLOBULINA

Tireoglobulina, uma proteína glicosilada de 670kDa, é envolvida na produção dos hormônios tireoideanos e é exclusiva do epitélio folicular. O anticorpo contra tireoglobulina tem expressão citoplasmática. A maioria dos carcinomas de tireóide expressa tireoglobulina, com exceção dos carcinomas anaplásicos e indiferenciados. (12, 80-85)

2.12 TTF-1

TTF-1 [*Thyroid Transcription Factor 1* (Fator de Transcrição Tireoidiano 1)], é um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento do diencéfalo fetal, e é expresso seletivamente no núcleo de células epiteliais do pulmão e de células foliculares da tireóide (que são derivadas do endoderma). (54, 86) Sendo um fator de transcrição, ele tem expressão nuclear. No pulmão, TTF-1 regula a expressão de surfactante e é um marcador comumente usado para adenocarcinoma de pulmão, sendo altamente específico para carcinoma de pulmão e de tireóide. (55) Porém, a sensibilidade do TTF-1 para adenocarcinoma de pulmão é relatada em torno de 75 a 80%. (55) TTF-1 é também um excelente marcador para carcinoma pulmonar de células pequenas, mas pode também ser expresso em uma percentagem de carcinomas de células pequenas de outros sítios. (86) Já o carcinoma escamoso pulmonar e o carcinoma de células grandes pulmonar expressam TTF-1 inconsistentemente.(86-88)

2.13 UROPLAKIN III

Uroplakinas compõem um grupo de 4 proteínas transmembrana (Uroplakin Ia, Uroplakin Ib, Uroplakin II e Uroplakin III) que são produtos de diferenciação específica das células uroteliais. (89)

Dentre as uroplakinas, a uroplakin III foi descrita tendo a expressão restrita à membrana apical da camada superficial (“umbrella”) do urotélio normal, e essa expressão foi mantida em 88% dos carcinomas uroteliais papilares não invasores, 53% dos carcinomas uroteliais invasores, e em 66% dos carcinomas uroteliais metastáticos, sugerindo uma possível aplicação diagnóstica. (90) Quando um anticorpo monoclonal contra a uroplakin III foi disponibilizado comercialmente, a sensibilidade e especificidade deste para carcinoma urotelial foi mais bem estudada. Sua expressão é citoplasmática.

Uroplakin III foi relatada como positivo em 60% dos carcinomas uroteliais primários e em 53% dos carcinomas uroteliais metastáticos, num estudo com um total de 67 carcinomas uroteliais (31 primários da bexiga, 1 primário do ureter, 3 primários da pélvis renal, e 32 carcinomas uroteliais metastáticos), e 318 carcinomas não uroteliais. (89) Todos esses 318 carcinomas não uroteliais foram negativos nesse estudo, resultando em alta especificidade. Outro estudo avaliou uroplakin III em 112 carcinomas uroteliais (81 primários da bexiga, 6 da pélvis renal e 25 metastáticos) e 498 tumores não-uroteliais e tecidos normais, e teve achados semelhantes: uroplakin III foi positivo em 57,1% dos tumores uroteliais e foi negativo em todos os outros tumores. (91) Um outro estudo teve resultado semelhantes comparando carcinoma urotelial de alto grau com carcinoma prostático pouco diferenciado, revelando positividade para uroplakin III em 60% dos carcinomas uroteliais e em nenhum dos carcinomas prostáticos. (92)

Baseados nesses estudos, a uroplakin III foi escolhida para integrar o painel de anticorpos desta pesquisa como sítio-específica para carcinomas uroteliais.

2.14 VILLIN

Villin é uma proteína do citoesqueleto que é encontrada na borda vilosa do epitélio do intestino e no epitélio do túbulo renal proximal. Os carcinomas cólon-retais têm uma borda vilosa vista à microscopia eletrônica como microvilos. Até 33% dos adenocarcinomas de pulmão também demonstram microvilos na microscopia eletrônica, e a sua presença se correlaciona com coloração positiva para villin. (93-96)

Anticorpos contra villin são úteis para identificar sua presença molecular (com expressão membranosa), que ocorre em quase todos os carcinomas cólon-retais. Villin também pode marcar positivamente neoplasias hepatocelulares num padrão canalicular semelhante à CEA policlonal. (35)

2.15 WT-1

WT1 [*Wilm's Tumor Protein* (Proteína do Tumor de Wilms)] é expressa em alto nível nos glomérulos renais e gônadas em desenvolvimento, e no mesotélio. Sua expressão é nuclear. Nas neoplasias, WT1 é expresso em mesotelioma, tumor de Wilm's, tumor desmoplástico de células redondas pequenas, e em neoplasias de origem mülleriana (especialmente carcinoma seroso de ovário, e em uma parte dos carcinomas serosos de endométrio). WT1 não é expresso em tumores do tipo endometrióide. (97-104)

2.16 CITOQUERATINA 7 (CK7):

CK7 é uma citoqueratina tipo II de 54kDa de peso molecular, e tem uma distribuição restrita se comparada a queratinas 8 e 18. Está presente em muitos epitélios simples, pseudo-estratificados, epitélio ductal e mesotélio, porém sua ausência no epitélio de tecidos como cólon, fígado e próstata é usada com fins diagnósticos. (105-109) Sua expressão é citoplasmática.

CK7 identifica urotélio mas é predominantemente negativo na maioria dos epitélios escamosos. A topografia restrita da CK7 a faz especialmente útil na avaliação da origem dos adenocarcinomas porque ela está presente na maioria dos carcinomas de mama, pulmão, ovário, pancreaticobiliares e uroteliais, porém está ausente (ou presente em somente raras células) de carcinomas de cólon, reto, rim e próstata.

2.17 CITOQUERATINA 20 (CK20)

CK20 é uma citoqueratina tipo I (ácida) de baixo peso molecular de 46kDa, cuja distribuição tissular é limitada predominantemente ao epitélio gastrointestinal e seus tumores, tumores mucinosos do ovário, e carcinomas de células de Merkel, e pode ser também expressa em adenocarcinomas mucinosos de pulmão. (110-112) Sua expressão é citoplasmática.

O uso combinado das citoqueratinas 7 e 20 permite dividir os carcinomas em quatro grupos: CK7+/CK20- (positivo para CK7 e negativo para CK20), CK7-/CK20+ (negativo para CK7 e positivo para CK20), CK7+/CK20+ (positivo para as duas) e CK7-/CK20- (negativo para as duas): (15-17)

- CK7+/CK20- : Adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma endocervical, carcinoma de endométrio, carcinoma seroso de ovário, carcinoma endometrióide de ovário, adenocarcinoma de pulmão, maior parte dos carcinomas pulmonares de células pequenas, parte dos colangiocarcinomas, carcinoma de tireóide, carcinoma de glândula salivar, parte dos carcinomas uroteliais, parte dos adenocarcinomas de estômago, parte dos adenocarcinomas de pâncreas.
- CK7-/CK20+ : Adenocarcinoma cólon-retal, carcinoma de células de Merkel, parte dos carcinomas de estômago (15,17)
- CK7+/CK20+ : Carcinoma urotelial, parte dos adenocarcinomas de pâncreas, carcinoma mucinoso de ovário, parte dos adenocarcinomas de estômago, parte dos colangiocarcinomas
- CK7-/CK20- : Adenocarcinoma de próstata, carcinoma escamoso, carcinoma de células renais tipo células claras, carcinoma hepatocelular, carcinoma de supra-renal, parte dos carcinomas pulmonares de células pequenas, pequena parte dos carcinomas de estômago

2.18 K903

O anticorpo 34 β E12 (também chamado queratina 903, ou K903) identifica um coquetel de queratinas que incluem os tipos 1, 5, 10 e 14. A K903 é então expressa em células basais e mioepiteliais em vários órgãos, e encontra-se também tipicamente presente no epitélio escamoso. Sua expressão é citoplasmática. (21-23, 113)

2.19 p16

p16 é uma proteína supressora de tumor que é uma inibidora da quinase dependente de ciclina e essencial para a regulação do ciclo celular. p16 inativa as quinases dependentes de ciclina que fosforilam o Rb (gene do Retinoblastoma), de forma que p16 pode desacelerar o ciclo celular. O estado de fosforilação do Rb por sua vez influencia a expressão de p16. Na infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV), os oncogenes E6 e E7 do HPV podem inativar a proteína Rb e assim levar a superexpressão de p16. (114) Assim, a superexpressão de p16 é um marcador indireto da infecção por HPV (em particular HPV de alto-risco), o que torna p16 útil na avaliação de neoplasia do trato genital inferior associada ao HPV. (115-122) Para ser considerada positivo, deve haver expressão nuclear de p16, com ou sem expressão citoplasmática associada. (123, 124)

Também há mecanismos de superexpressão de p16 que são independentes do HPV, então p16 pode ser expresso em tumores que não necessariamente têm infecção por HPV, como por exemplo carcinoma seroso de ovário. (125)

2.20 p63

p63 é um homólogo do gene supressor de tumor p53, e sua expressão é nuclear. p63 codifica pelo menos seis proteínas diferentes que têm uma variedade

de funções biológicas, incluindo um papel na diferenciação urotelial. A maioria dos carcinomas uroteliais expressa p63, porém a expressão pode estar parcialmente ausente em carcinomas uroteliais invasivos de alto grau. (126, 127)

Além dos carcinomas uroteliais, p63 é vista com alta frequência em carcinomas escamosos; e quando usada em conjunto com o anticorpo CK5/6 traz alta sensibilidade e especificidade para diferenciação escamosa. (26, 29)

2.21 AE1/AE3

AE1/AE3 é um coquetel de citoqueratinas, sendo útil em patologia cirúrgica para estabelecer diferenciação epitelial em tumores pouco diferenciados ou indiferenciados na morfologia. Sua expressão é citoplasmática. Ou seja, para estabelecer se um tumor é um carcinoma, e não um linfoma, sarcoma ou melanoma, etc. (128, 129)

2.22 CAM5.2

Cam5.2 é um anticorpo que reconhece quase exclusivamente as citoqueratinas 8 e 18, que são citoqueratinas simples, de baixo peso molecular. As citoqueratinas epiteliais simples são as primeiras a aparecer no desenvolvimento embrionário porque são expressas em virtualmente todos os tecidos epiteliais não estratificados, ductais, e pseudo-estratificados. Porque essas citoqueratinas são distribuídas em vários tipos de epitélio, elas são úteis para identificar diferenciação epitelial (carcinoma). (128-130) Sua expressão é citoplasmática. Quase todos os mesoteliomas e carcinomas (exceto carcinoma escamoso) contêm as citoqueratinas simples 8 e 18. Alguns órgãos viscerais como o fígado contém apenas as citoqueratinas 8 e 18. (24, 131)

2.23 TÉCNICA DE *MICROARRAY*

Diferentes métodos já foram descritos para possibilitar o estudo de um grande número de tecidos simultaneamente em um único corte histológico. Em 1986, Battifora descreveu o bloco de tecido multi-tumor, também chamado de “método salsicha”, onde várias diferentes amostras de tecido são embebidas em um único bloco de parafina. (132) Essa técnica era útil no desenvolvimento de anticorpos monoclonais pois possibilitava screening de anticorpos monoclonais em vários tipos de tecidos e neoplasias, e estabelecimento de quais anticorpos funcionavam em cada tecido. (132)

Porém, o número de amostras que podia ser incluído era muito limitado, e a identificação de uma amostra específica no meio da grande “salsicha” era uma tarefa difícil. (133) Em 1990, Battifora descreveu uma melhoria desse método salsicha, distribuindo os tecidos de forma uniforme como um tabuleiro de xadrez, de forma a facilitar a identificação de um tecido pela sua posição no corte histológico. (134)

Em 1998, Kononen et al. descreveram a elegante técnica de *microarray* de tecido, que utilizava um instrumento de “punching” de alta precisão, possibilitando a localização exata e reproduzível de amostras de tecido distintas. (135) Essa técnica revolucionou a pesquisa em patologia, por permitir análise de tecidos em alta escala com menor custo podendo ser usada vários tipos de experimentos com histoquímica ou imuno-histoquímica, ou em combinação com técnicas moleculares (136-138) A técnica de *microarray* minimiza o dano ao tecido (comparada, por exemplo, com o método de salsicha ou xadrez), e o bloco doador ainda pode ser normalmente cortado caso necessário para futuros estudos diagnósticos ou prognósticos do paciente. Lâminas seccionadas (no futuro) do bloco doador apresentarão apenas um pequeno círculo ausente de onde o cilindro foi extraído, mas o resto do tecido permanece inalterado e com todos os detalhes presentes. (139)

3 JUSTIFICATIVA

Para caracterizar o sítio primário de uma metástase, e/ou determinar se um carcinoma é primário ou secundário (metastático), o uso de marcadores imuno-histoquímicos é de grande valia.

Alguns marcadores gerais como citoqueratinas podem proporcionar uma triagem de possíveis sítios primários, selecionando grupos menores dentro de uma vasta gama de opções. Alguns marcadores mais recentes, entretanto, podem ser considerados “sítio-específicos”, sendo expressos em somente um ou dois órgãos.

Estes marcadores sítio-específicos de início eram em pequeno número, porém novos marcadores sítio-específicos vem sendo descritos cada vez mais. Entretanto, muitos dos novos marcadores considerados sítio-específicos quando descritos pela primeira vez, são, depois, demonstrados em muitos outros diferentes órgãos, sendo assim comprovada que a especificidade deles é consideravelmente menor do que se inicialmente acreditava. Desta forma, é fundamental que a especificidade de novos marcadores seja testada e comprovada em diversos tipos de tecido e tumores, para validar a sua utilização na prática diária da patologia cirúrgica, para casos individuais.

4 OBJETIVOS

1. Testar marcadores sítio-específicos em carcinomas de vários órgãos.
2. Elaborar painéis de marcadores recomendados para serem utilizados em análise de carcinomas de sítio primário desconhecido.

5 MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética (*Institutional Review Board*) do Allegheny General Hospital em Pittsburgh, Pensilvânia, Estados Unidos. O Allegheny General Hospital é um hospital terciário com um grande volume de cirurgias de diversas especialidades e grande número de casos oncológicos. Tem um grande número de biópsias e cirurgias de câncer de diversos órgãos, e é referência em cirurgias oncológicas para vários estados da região próxima a Pittsburgh.

Os arquivos eletrônicos da patologia do Allegheny General Hospital foram pesquisados para a obtenção de laudos de **carcinoma** primário de qualquer órgão, emitidos durante os anos de 2000 a 2008.

Os laudos foram examinados para excluir carcinomas secundários. No momento que examina as lâminas para laudar, os patologistas do Allegheny General Hospital sempre recebem junto com a requisição, os diagnósticos de todos os laudos anteriores de patologia e citopatologia daquele paciente na instituição. Quando há suspeita de carcinoma metastático, geralmente imuno-histoquímica é realizada, e/ou um comentário é colocado no laudo após o diagnóstico. Os laudos examinados para esse estudo não continham diagnósticos de laudos anteriores do paciente, porém na presença de comentários ou resultados imuno-histoquímicos que pusessem em dúvida o fato do carcinoma ser primário, o caso era excluído do estudo.

No total 904 casos foram selecionados. Em alguns tipos histológicos foram incluídos todos os casos encontrados que não preenchiam critérios de exclusão (por exemplo colangiocarcinoma, adenocarcinoma de endocérvice, carcinoma hepatocelular, carcinoma de glândulas salivares). Nos tipos histológicos mais comuns (por exemplo carcinoma de cólon, de mama), foram selecionados dentre os encontrados casos em número suficiente para garantir uma amostra adequada. Casos de diferentes graus de diferenciação foram selecionados, quando possível (carcinomas bem diferenciados, moderadamente diferenciados, e pouco diferenciados).

Em suma, foram critérios de inclusão:

- Laudo de carcinoma
- Tumor primário
- Inclusão de diferentes órgãos e tipos histológicos
- Inclusão de diferentes graus de diferenciação

Foram critérios de exclusão:

- Presença no laudo de comentários ou resultados imuno-histoquímicos que pusessem em dúvida o fato do carcinoma ser primário
- Número suficiente de casos daquele tipo histológico já incluídos
- Caso com bloco ou lâmina não encontrada nos arquivos
- Ausência de tumor de reserva suficiente no mesmo bloco ou em outro do mesmo caso
- Profundidade insuficiente no bloco para obtenção do cilindro doador

Os 904 carcinomas primários incluídos estavam assim distribuídos:

- **34 Carcinomas Escamosos de Pulmão**
- **90 Carcinomas de Pulmão de outros tipos histológicos:** 42 Adenocarcinomas, 21 Carcinomas de pequenas células, 12 Carcinomas de grandes células, 15 Carcinóides.
- **52 Carcinomas Renais:** 25 Carcinomas renais de células claras, 17 Carcinomas renais tipo papilar, 10 Carcinomas renais tipo cromóforo
- **7 PEN [*Pancreatic Endocrine Neoplasia (Neoplasia Endócrina Pancreática)*]**
- **13 Carcinóides gastrointestinais:** Carcinóide de diferentes sítios do trato gastrointestinal
- **16 Adenocarcinomas de estômago**
- **25 Adenocarcinomas de esôfago ou da Junção Esôfago-Gástrica (JEG)**
- **57 Carcinomas de Tireóide:** 46 Papilares, 7 Foliculares, 2 Medulares, 2 Anaplásicos
- **34 Carcinomas Escamosos de pele (Carcinoma espinocelular)**
- **54 Carcinomas Escamosos anogenitais:** 14 de Cérvix uterina, 4 de Vagina, 16 de Vulva, 8 de Pênis, 9 de Ânus, 3 de Reto

- **10 Carcinomas Escamosos de esôfago**
- **51 Carcinomas Escamosos de Cabeça e Pescoço:** 19 de Língua, 10 de Amígdalas, 5 de Cavidade Oral, 4 de Faringe, 13 de Laringe
- **48 Adenocarcinomas de Pâncreas (Exócrino)**
- **43 Adenocarcinomas de Próstata**
- **75 Carcinomas Uroteliais:** 47 de Bexiga, 19 de Rim, 9 de Ureter
- **14 Hepatomas (Carcinomas hepatocelulares)**
- **11 Colangiocarcinomas**
- **80 Adenocarcinomas Cólon-retais:** 44 Adenocarcinomas de cólon, 36 Adenocarcinomas de reto
- **15 Carcinomas de Glândula Salivar:** Carcinomas de diferentes tipos histológicos de glândulas salivares maiores ou menores
- **86 Carcinomas de Mama:** 51 Carcinomas ductais, 29 Carcinomas lobulares, 3 Carcinomas mistos ductal e lobular, 3 Carcinomas mucinosos
- **40 Carcinomas de Endométrio:** 27 Carcinomas endometrióides, 5 Carcinomas serosos, 3 Carcinomas de células claras, 4 Tumores malignos mistos Müllerianos, 1 Carcinoma indiferenciado
- **45 Carcinomas de Ovário:** 23 Carcinomas serosos, 7 Carcinomas mucinosos, 5 Carcinomas de células claras, 5 Carcinomas endometrióides, 1 Tumor maligno misto Mülleriano, 4 Carcinomas pouco diferenciados
- **4 Adenocarcinomas de Endocérvice:** 3 Adenocarcinomas, 1 Carcinoma tipo “*glassy cell*”

De cada caso, foram obtidas lâminas correspondentes, dos arquivos de lâminas do Departamento de Patologia do Allegheny General Hospital. As lâminas foram revistas para confirmação do diagnóstico, e de cada caso foi escolhida uma lâmina representativa do carcinoma de cada respectivo órgão. Uma lâmina de cada caso foi marcada (sob visualização microscópica) com caneta permanente com um círculo representando a área com o carcinoma correspondente. Durante essa avaliação tomou-se o cuidado de garantir que a mesma lâmina ou outra lâmina do mesmo caso ainda tivesse mais tumor presente, de forma a preservar tecido suficiente arquivado no bloco para possível uso futuro do paciente após obtenção do cilindro doador. Caso não houvesse tumor de reserva suficiente, o caso era excluído. O bloco correspondente a cada respectiva lâmina foi obtido dos arquivos de tecido

do Allegheny General Hospital. Cada bloco foi avaliado para adequação para doação de tecido para *microarray*, para garantir uma profundidade de tecido adequada. Se não houvesse nenhum bloco de tumor no caso com profundidade suficiente para todos os cortes necessários para o estudo, o caso era excluído.

Cada bloco foi sobreposto a sua lâmina correspondente, para achar a exata área marcada na lâmina, que foi então marcada no bloco correspondente. Essa marcação no bloco exige paciência e dedicação, pois primeiro é necessário orientar a lâmina com o bloco pois o corte está frequentemente invertido ou num ângulo diferente do bloco. Uma outra dificuldade considerável é que embora a lâmina seja cortada do bloco, após o processamento o tecido da lâmina se distende e fica consideravelmente maior que o do bloco, distorcendo pontos de comparação e dificultando a marcação.

Pela técnica de *microarray* de tecido, 10 blocos de parafina foram construídos com os cilindros de tecido dos 904 carcinomas de diversos órgãos (um máximo de 100 carcinomas diferentes por bloco).

A técnica de *microarray* consiste em obter “uma biópsia” do bloco de parafina, com extração de um pequeno cilindro do bloco doador e “transplante” desse cilindro para o bloco receptor. O bloco receptor consiste inicialmente em um bloco puro de parafina. A máquina utilizada foi o “*Manual Tissue Arrayer*” produzido pela Beecher Instruments, San Prairie, Wisconsin, Estados Unidos. Essa máquina possui duas agulhas (receptora e doadora) que são conectadas por um pêndulo que permite movimentos alternados dessas duas agulhas. A agulha para perfurar o bloco doador vem em tamanhos padrão, com opções de diâmetro de 0,6mm, 1,0mm, 1,5mm, e 2,0mm. O diâmetro da agulha usada neste estudo foi de 0,6mm.

Com o auxílio da máquina de *microarray*, um cilindro de parafina foi obtido da área marcada do bloco doador e transportado para o bloco receptor, onde é feito imediatamente antes um furo de diâmetro ligeiramente inferior ao diâmetro do cilindro que será transplantado. O cilindro retirado do bloco doador é inserido no furo do bloco receptor com o auxílio da máquina de *microarray*, que é controlada com régua de precisão em dois eixos, alinhando perfeitamente a agulha que contém o cilindro a ser transplantando com o furo na parafina. Devido ao fato do cilindro ser ligeiramente mais largo que o furo, o cilindro se encaixa com segurança no bloco receptor, evitando que o cilindro possa deslizar para fora do bloco durante o processamento subsequente. Esse processo foi repetido uma centena de vezes para

a formação de cada bloco receptor, conforme o “mapa” da posição dos casos. Cada bloco receptor recebeu 100 cilindros de carcinoma distribuídos em 10 colunas de 10 linhas. Além disso, cada bloco receptor recebeu 3 cilindros de baço normal com a função de orientação e mapeamento.

Cada cilindro foi retirado de um bloco doador diferente, possibilitando a construção de um único bloco de parafina com tecidos de cem pacientes diferentes. Após a confecção do bloco do doador, este foi aquecido, invertido e pressionado contra a superfície plana de uma lâmina de vidro, para alinhar todos os cilindros no mesmo nível. O aquecimento também proporciona a fusão dos cilindros transplantados com a parafina do bloco, garantindo que o tecido se comportará uniformemente no processamento posterior.

Após a fusão e nivelamento dos cilindros, o bloco receptor está pronto para ser processado similarmente a um bloco comum de parafina. Múltiplos cortes foram feitos de cada bloco receptor, corados com coloração de rotina ou com imunohistoquímica e examinados no microscópio.

Os 904 blocos marcados foram divididos em 10 grupos para confeccionar 10 blocos de *microarray*: 9 grupos de 100 e um grupo de 37. (Nota: Originalmente havia 934 casos, dos quais 3 foram repetidos por questões técnicas no *microarray*, de forma que havia 937 cilindros de 934 carcinomas. Desses 934, 30 foram excluídos por diversos motivos, tais como erro na seleção descoberto a posteriori, tipo muito raro de carcinoma dificultando a análise por ser caso isolado, entre outros).

Foi feito um “mapa” da localização dos carcinomas em cada bloco de *microarray*, com 10 linhas numeradas de 1 a 10 e 10 colunas numeradas de “A” a “J”. (Vide figura 1). À esquerda da coluna A foi colocada uma coluna extra, com as linhas 8 a 10 preenchidas com cilindros de baço normal, para possibilitar posicionamento e identificação do *microarray*.

Dez blocos de *microarray* foram confeccionados de acordo com o mapa e assim denominados: SSTMA-1, SSTMA-2, SSTMA-3, SSTMA-4, SSTMA-5, SSTMA-6, SSTMA-7, SSTMA-8, SSTMA-9, SSTMA-10. (SSTMA: *site-specific tissue microarray*). Durante a confecção do bloco receptor, manteve-se o “mapa” de cada tecido doado com a posição correspondente, para que durante o exame microscópico seja possível fazer a correspondência do resultado do exame imunohistoquímico com o bloco do respectivo paciente de onde o cilindro de tecido foi obtido.

SSTMA-1

1	P06-9245	P05-37752	P08-6946	P06-3361	P06-2962	P05-1861	P05-18954	P05-28353	P07-9068	P05-1861	
2	P03-1537	P05-1128	P03-1539	P01-9936	P08-738	P03-1542	P05-1128	P07-438	P08-33	P05-4448	
3	P04-2107	P05-1278	P04-2109	P01-18956	P04-2111	P04-4390	P05-1278	P07-516	P08-348	P08-1300	
4	P01-2135	P06-4174	P01-2137	P08-10186	P01-2139	P03-9345	P06-94	P07-1539	P02-10389	P05-10278	
5	P02-3679	P03-4369	P02-3681	P02-11312	P02-3683	P03-1541	P01-15554	P07-1909	P02-5624	P04-5077	
6	P06-4169	P01-6341	P06-4171	P02-5567	P06-4173	P03-6422	P02-10388	P01-1689	P02-3684	P06-4170	
7	P03-4364	P05-5484	P03-4366	P05-18953	P03-4368	P05-9259	P07-2222	P07-3319	P08-2921	P03-4365	
8	BAÇO	P04-5072	P05-6803	P01-5838	P04-2112	P04-5076	P05-4764	P06-9215	P07-3642	P08-4417	P04-5073
9	BAÇO	P02-5565	P05-7161	P08-2175	P04-32463	P02-5569	P04-2983	P07-13354	P07-3686	P08-5889	P02-5566
10	BAÇO	P01-5835	P05-7482	P01-5837	P03-4373	P01-5839	P02-13894	P06-11133	P07-4221	P06-1097	P01-5836
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	

Figura 1: Exemplo de “mapa” da localização dos carcinomas em um bloco de *microarray*.

Há cem casos distribuídos em 10 linhas numeradas de 1 a 10 e 10 colunas numeradas de “A” a “J”. Os três cilindros de baço normal estão posicionados nas linhas 8 a 10, à esquerda da coluna A, para orientação.

Um mínimo de 25 lâminas foi cortado em cada bloco SSTMA. Uma lâmina de cada bloco SSTMA foi corada de hematoxilina-eosina (HE), para facilitar a interpretação da imuno-histoquímica por comparação da histomorfologia (figura 2). E uma lâmina de cada bloco SSTMA foi corada para cada um dos 24 marcadores imuno-histoquímicos: CDX-2, CK5/6, GCDFP-15, Hep-Par1, Mammaglobin, Napsin A, PAP, Pax-2, PSA, RCC, Receptor de estrogênio, Receptor de progesterona, Tiroglobulina, TTF-1, Uroplakin, Villin, WT-1, CK7, CK20, K903, p16, p63, AE1/AE3 e Cam5.2. A tabela 1 mostra os detalhes do método usado em cada anticorpo.



Figura 2. A: Bloco de microarray. B: Lâmina cortada de bloco de microarray e corada com HE.

A localização dos cilindros de tecido pode ser comparada no bloco e na lâmina, e também no mapa da Figura 1. Os três cilindros de baço para orientação podem ser vistos em baixo à esquerda.

Tabela 1 - Caracterização dos diversos anticorpos utilizados no estudo incluindo especificação dos respectivos clones, identificação dos fabricantes de cada um deles, graus de diluição, tipos de recuperação antigênica e sistemas de automação utilizados

Anticorpos	Clones	Fabricantes	Diluição	Tipos de Recuperação antigênica	Sistemas de automação utilizados
AE1/AE3	AE1/AE3	Dako	1:100	Protease 1	Ventana Nexes
Cam5.2	CAM5.2	Becton Dickinson	1:4	Protease 1	Ventana Nexes
CDX-2	CDX2-88	Biogenex	1:30	CC1	Ventana XT
CK20	PW31	Leica	Nenhuma	ER 2	Leica BOND
CK5/6	D5/16B4	Dako	1:20	CC1	Ventana XT
CK7	OV-TL 12/30	Dako	1:100	Protease 1	Ventana Nexes
ER	SP1	Ventana	Nenhuma	CC1	Ventana XT
GCDFP-15	D-6	Signet	1:150	Protease 1	Ventana Nexes
Hep-Par1	OCH 1E5	Dako	1:50	CC1	Ventana XT
K903	34 β E12	Dako	1:200	CC1	Ventana XT
Mammaglobin	304-1A5&31A5	Zeta	Nenhuma	CC1	Ventana XT
Napsin A	TMU-Ad 02	IBL	1:50	CC1	Ventana XT
p16	p16INK4a	MTM	Nenhuma	CC1	Ventana XT
p63	4A4	Biocare	Nenhuma	CC1	Ventana XT
PAP	PASE/4LJ	Ventana	Nenhuma	CC1	Ventana XT
Pax-2	Polyclonal	Covance	1:120	ER 1	Leica BOND
PR	1E2	Ventana	Nenhuma	CC1	Ventana XT
PSA	ER-PR8	Ventana	Nenhuma	CC1	Ventana XT
RCC	66.4.C2	Biocare	Nenhuma	CC1	Ventana XT
Tireoglobulina	Polyclonal	Dako	1:4	Nenhuma	Ventana Nexes
TTF-1	8G7G3/1	Dako	1:80	CC1	Ventana XT
Uroplakin III	AU1	Fitzgerald	Nenhuma	ER 2	Leica BOND
Villin	CWWB1	Ventana	Nenhuma	CC1	Ventana XT
WT-1	6F-H2	Dako	1:80	CC1	Ventana XT

CC1: “Cell Conditioning 1” , produto 950-124 do catálogo da *Ventana Medical Systems* (www.ventanamed.com). Solução baseada em tris com pH levemente básico, que em temperaturas elevadas quebra as ligações covalentes formadas pelo formol no tecido.

Protease 1: Produto número 760-2018 do catálogo da *Ventana Medical Systems* (www.ventanamed.com). É uma endopeptidase para digestão enzimática.

ER1: Solução de Recuperação de Epítomos Bond 1 (*Bond Epitope Retrieval Solution 1*), produto número AR9961 do catálogo da Leica (www.leicamicrosystems.com). É uma solução baseada em citrato, de pH 6.0, específica para recuperação antigênica induzida pelo calor no sistema automatizado Bond da Leica.

ER2: Solução de Recuperação de Epítomos Bond 2 (*Bond Epitope Retrieval Solution 2*), produto número AR9640 do catálogo da Leica (www.leicamicrosystems.com). É uma solução baseada em EDTA, de pH 9.0, específica para recuperação antigênica induzida pelo calor no sistema automatizado Bond da Leica.

Ventana XT: BenchMark XT é um sistema automatizado de preparação de imuno-histoquímica da *Ventana Medical Systems*. (www.ventanamed.com).

Ventana Nexes: NexES IHC era um sistema automatizado de preparação de imuno-histoquímica da *Ventana Medical Systems* que saiu de linha em 31 de dezembro de 2010. (www.ventanamed.com).

Leica Bond: Sistema automatizado de preparação de imuno-histoquímica da Leica. (www.leicamicrosystems.com)

Depois de coradas, as lâminas foram avaliadas microscopicamente, e cada círculo de tecido corado foi examinado e interpretado como positivo, negativo ou excluído.

Foram marcados como excluídos os círculos de tecido:

- ausentes da lâmina (se descolaram da lâmina durante o processamento), (figura 3)
- completamente dobrados ou enrugados impossibilitando interpretação
- com ausência de células epiteliais de carcinoma (apresentando somente tecido benigno ou somente estroma)
- com menos de 5 células epiteliais de carcinoma, comprometendo a segurança da interpretação

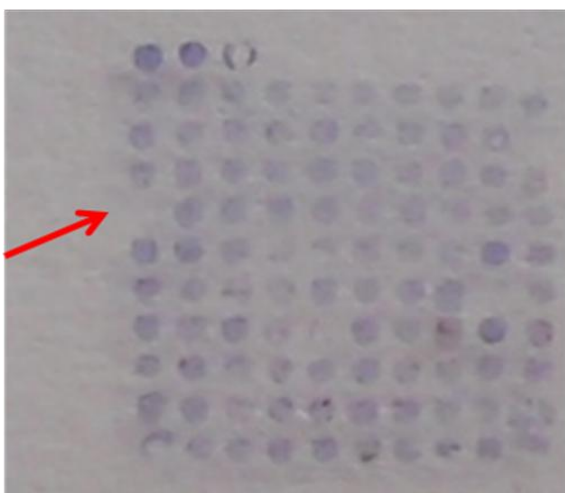


Figura 3: Exemplo de caso excluído (seta) porque o “círculo” de tecido se desprendeu da lâmina durante o processamento.

Foram interpretados como negativos os círculos com um mínimo de 5 células epiteliais malignas presentes, e nenhuma célula de carcinoma positiva para o marcador ou menos de 5% das células de carcinoma positivas para o marcador (figura 4).

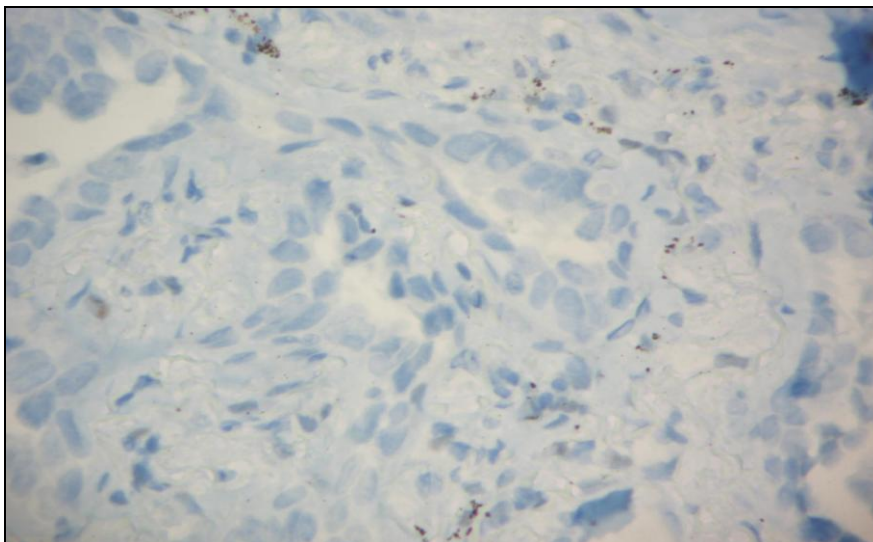


Figura 4: Exemplo de caso interpretado como negativo. Glândulas de adenocarcinoma são claramente visíveis, em azul (negativo).

Foram interpretados como positivos os círculos com um mínimo de 5% das células de carcinoma positivas para o marcador (figura 5), segundo a expressão esperada para cada marcador:

- Nuclear: TTF-1, receptor de estrogênio, receptor de progesterona , CDX-2, WT1, p63, Pax-2
- Citoplasmática: GCDFP-15, mammaglobin, PSA, PAP, tireoglobulina, HepPar-1, RCC, AE1/AE3, uroplakin, Cam5.2, K903, CK5/6, CK7, CK20
- Citoplasmática granular: Napsin A
- Membranosa: Villin
- Nuclear e citoplasmática: p16

A percentagem mínima de células positivas para considerar um caso positivo varia na literatura conforme os autores. Alguns autores consideram positivos casos com mais de 10% das células positivas. (70, 140, 141) Outros trabalhos não usam ponto de corte, como por exemplo o estudo de Nadji et al, que avaliou 5993 carcinomas de mama com imuno-histoquímica para receptores de estrogênio e progesterona, e considerou qualquer expressão nuclear como positiva, independente da percentagem de células. (9) Outros autores utilizam 5% como ponto de corte, como por exemplo Kunju et al, que num estudo de carcinomas prostáticos e uroteliais com PSA, K903 e p63 considerou casos positivos se mais de 5% das células tumorais demonstrassem forte reatividade (dividindo os positivos em focal se 5-50%, e difusa se mais de 50%). (142) No presente estudo, escolhemos 5% como

percentagem de corte por ser este o valor mais aproximado do que fazemos na prática clínica intuitivamente.

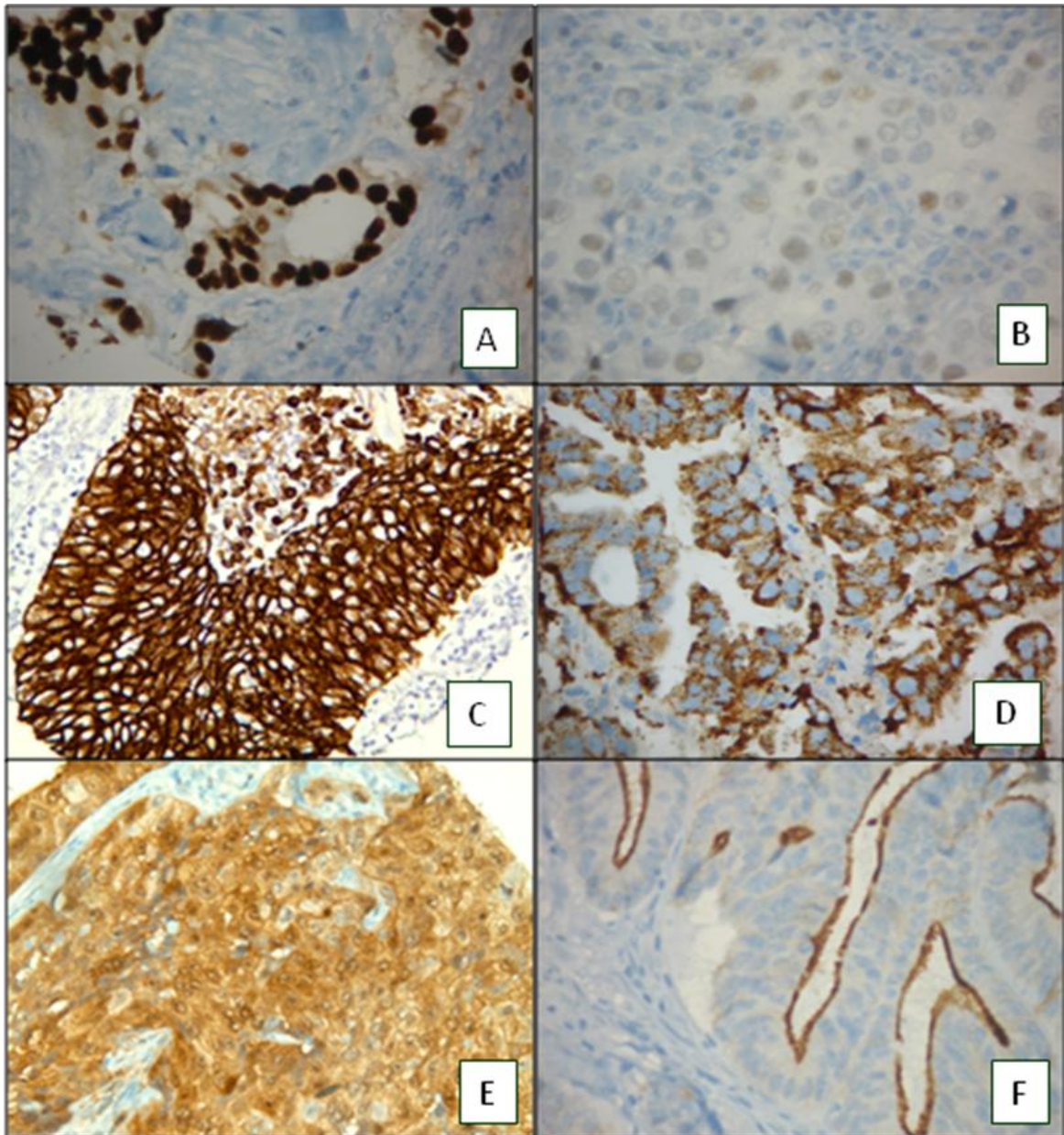


Figura 5: Exemplos de diferentes tipos de expressão: A: Expressão nuclear de receptor de estrogênio, fortemente positivo em carcinoma ductal de mama, B: Expressão nuclear de receptor de estrogênio, intensidade fraca porém positivo em adenocarcinoma de pulmão, C: Expressão citoplasmática de CK7 em carcinoma escamoso, D: Expressão granular citoplasmática de Napsin A em adenocarcinoma de pulmão, E: Expressão nuclear e citoplasmática de p16 em carcinoma escamoso, F: Expressão membranosa de villin em adenocarcinoma de cólon

6 RESULTADOS

As tabelas 2 a 25 mostram os resultados para cada marcador, agrupados por órgão e/ou tipo histológico. Vale notar que os casos excluídos variam de marcador para marcador, devido a fatores como profundidade diferente do corte e processamento diferente das lâminas. Por exemplo, a lâmina corada com AE1/AE3 pode ter perdido o “círculo de tecido” do primeiro carcinoma escamoso de pulmão da coluna, enquanto que a lamina corada com Cam5.2 pode ter o cilindro do primeiro carcinoma escamoso presente, mas perdido o do terceiro carcinoma escamoso, etc.

CDX-2 (tabela 2) foi positivo em quase todos os carcinomas de cólon-reto (95%). Quanto aos outros sítios, também foi um bom marcador para carcinóide gastrointestinal (62%), para adenocarcinoma de estômago (36%), e adenocarcinoma de esôfago e de junção esôfago-gástrica (52%).

Outros órgãos além do trato gastrointestinal que tiveram positividade aberrante para CDX-2 foram: tireóide (19%), carcinomas não escamosos de pulmão (1%), carcinoma escamoso anogenital (2%; que foi 1 carcinoma escamoso de vulva), adenocarcinoma de pâncreas (7%), próstata (3%), carcinoma urotelial (7%), colangiocarcinoma (22%), endométrio (15%), e ovário (18%).

Tabela 2 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CDX-2 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

CDX-2	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	29	5	34	29	0%
Pulmão Outros	1	83	6	90	84	1%
Rim	0	52	0	52	52	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	6	1	7	6	0%
Carcinóide gastrointestinal	8	5	0	13	13	62%
Estômago	5	9	2	16	14	36%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gástrica	11	10	4	25	21	52%
Tireóide	9	39	9	57	48	19%
Escamoso pele	0	24	10	34	24	0%
Escamoso anogenital	1	48	5	54	49	2%
Escamoso esôfago	0	8	2	10	8	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	42	9	51	42	0%
Pâncreas (Exócrino)	3	41	4	48	44	7%
Próstata	1	38	4	43	39	3%
Carcinoma Urotelial	5	65	5	75	70	7%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	2	7	2	11	9	22%
Cólon-retal	63	3	14	80	66	95%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	0	74	12	86	74	0%
Endométrio	6	33	1	40	39	15%
Ovário	8	36	1	45	44	18%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

CK5/6 (tabela 3) foi positivo em 60% dos carcinomas uroteliais, e quase 100% dos carcinomas escamosos. Quanto aos carcinomas não escamosos de outros sítios, teve positividade variando de 0% (rim, PEN, carcinóide gastrointestinal, próstata, carcinomas hepatocelulares, e endocérvice), menor que 15% (pulmão, adenocarcinoma de esôfago e JEG, tireóide, cólon-retal e mama), valores baixos a intermediários (23% em estômago, 30% em colangiocarcinoma, 33% em ovário, 36% em endométrio, 60% em adenocarcinoma de pâncreas), até a alta positividade de 87% em carcinoma de glândula salivar.

Tabela 3 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CK5/6 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

CK5/6	+	-	e	Total		%
Pulmão Escamoso	31	1	2	34	32	97%
Pulmão Outros	5	79	6	90	84	6%
Rim	0	52	0	52	52	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	7	0	7	7	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	3	10	3	16	13	23%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	1	18	6	25	19	5%
Tireóide	2	49	6	57	51	4%
Escamoso pele	26	0	8	34	26	100%
Escamoso anogenital	46	0	8	54	46	100%
Escamoso esôfago	9	0	1	10	9	100%
Escamoso Cabeça e Pescoço	41	0	10	51	41	100%
Pâncreas (Exócrino)	25	17	6	48	42	60%
Próstata	0	36	7	43	36	0%
Carcinoma Urotelial	43	29	3	75	72	60%
Hepatoma	0	13	1	14	13	0%
Colangiocarcinoma	3	7	1	11	10	30%
Cólon-retal	10	61	9	80	71	14%
Glândula Salivar	13	2	0	15	15	87%
Mama	11	69	6	86	80	14%
Endométrio	14	25	1	40	39	36%
Ovário	14	29	2	45	43	33%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

GCDFP-15 (figura 6) foi positivo em 67% dos carcinomas de mama e 27% dos carcinomas de glândula salivar. Porém GCDFP-15 também teve positividade importante em vários outros órgãos (tabela 4). Porém, diferente dos outros marcadores de mama, GCDFP-15 foi negativo em todos os carcinomas de endométrio, todos de endocérvice, e em quase todos os carcinomas de ovário (foi positivo em somente 2% dos carcinomas de ovário).

Tabela 4 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo GCDFP-15 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

GCDFP-15	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	12	17	5	34	29	41%
Pulmão Outros	30	49	11	90	79	38%
Rim	10	41	1	52	51	20%
PEN (Pâncreas endócrino)	2	5	0	7	7	29%
Carcinóide gastrointestinal	1	12	0	13	13	8%
Estômago	3	11	2	16	14	21%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	8	14	3	25	22	36%
Tireóide	1	50	6	57	51	2%
Escamoso pele	23	4	7	34	27	85%
Escamoso anogenital	40	3	11	54	43	93%
Escamoso esôfago	4	4	2	10	8	50%
Escamoso Cabeça e Pescoço	30	9	12	51	39	77%
Pâncreas (Exócrino)	0	43	5	48	43	0%
Próstata	8	31	4	43	39	21%
Carcinoma Urotelial	1	71	3	75	72	1%
Hepatoma	0	13	1	14	13	0%
Colangiocarcinoma	1	9	1	11	10	10%
Cólon-retal	1	76	3	80	77	1%
Glândula Salivar	4	11	0	15	15	27%
Mama	53	26	7	86	79	67%
Endométrio	0	39	1	40	39	0%
Ovário	1	43	1	45	44	2%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Hep-Par1 (tabela 5) foi positivo em 92% dos carcinomas hepatocelulares. É importante notar que ele também teve positividade em outros órgãos, embora bem menor: Carcinomas não escamosos de pulmão (16%), rim 2%, estômago 21%, adenocarcinoma de esôfago e junção esôfago-gástrica (21%), carcinoma espinocelular 4%, adenocarcinoma de pâncreas 7%, carcinoma de próstata 5%, colangiocarcinoma 30%, cólon-retal 6%, mama 1%, endométrio 5%, e ovário 9%.

Tabela 5 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo HepPar-1 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*.

HepPar-1	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	28	6	34	28	0%
Pulmão Outros	13	68	9	90	81	16%
Rim	1	50	1	52	51	2%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	6	1	7	6	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	3	11	2	16	14	21%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gástrica	4	15	6	25	19	21%
Tireóide	0	53	4	57	53	0%
Escamoso pele	1	25	8	34	26	4%
Escamoso anogenital	0	41	13	54	41	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	43	8	51	43	0%
Pâncreas (Exócrino)	3	42	3	48	45	7%
Próstata	2	36	5	43	38	5%
Carcinoma Urotelial	0	72	3	75	72	0%
Hepatoma	12	1	1	14	13	92%
Colangiocarcinoma	3	7	1	11	10	30%
Cólon-retal	4	65	11	80	69	6%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	1	79	6	86	80	1%
Endométrio	2	37	1	40	39	5%
Ovário	4	40	1	45	44	9%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Mammaglobin (figura 6) foi positivo em 49 casos sobre um total de 80 (61%) carcinomas de mama, porém teve positividade importante em todos os outros órgãos (tabela 6). De 729 carcinomas não-mamários testados, mammaglobin foi positivo em 268 casos (37%).

Tabela 6 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Mammaglobin em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

Mammaglobin	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	7	22	5	34	29	24%
Pulmão Outros	20	62	8	90	82	24%
Rim	30	21	1	52	51	59%
PEN (Pâncreas endócrino)	3	4	0	7	7	43%
Carcinóide gastrointestinal	2	11	0	13	13	15%
Estômago	3	11	2	16	14	21%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	10	11	4	25	21	48%
Tireóide	29	24	4	57	53	55%
Escamoso pele	3	23	8	34	26	12%
Escamoso anogenital	8	28	18	54	36	22%
Escamoso esôfago	7	1	2	10	8	88%
Escamoso Cabeça e Pescoço	12	30	9	51	42	29%
Pâncreas (Exócrino)	13	31	4	48	44	30%
Próstata	23	15	5	43	38	61%
Carcinoma Urotelial	9	64	2	75	73	12%
Hepatoma	3	10	1	14	13	23%
Colangiocarcinoma	3	7	1	11	10	30%
Cólon-retal	25	43	12	80	68	37%
Glândula Salivar	7	8	0	15	15	47%
Mama	49	31	6	86	80	61%
Endométrio	27	12	1	40	39	69%
Ovário	23	21	1	45	44	52%
Endocérvice	1	2	1	4	3	33%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

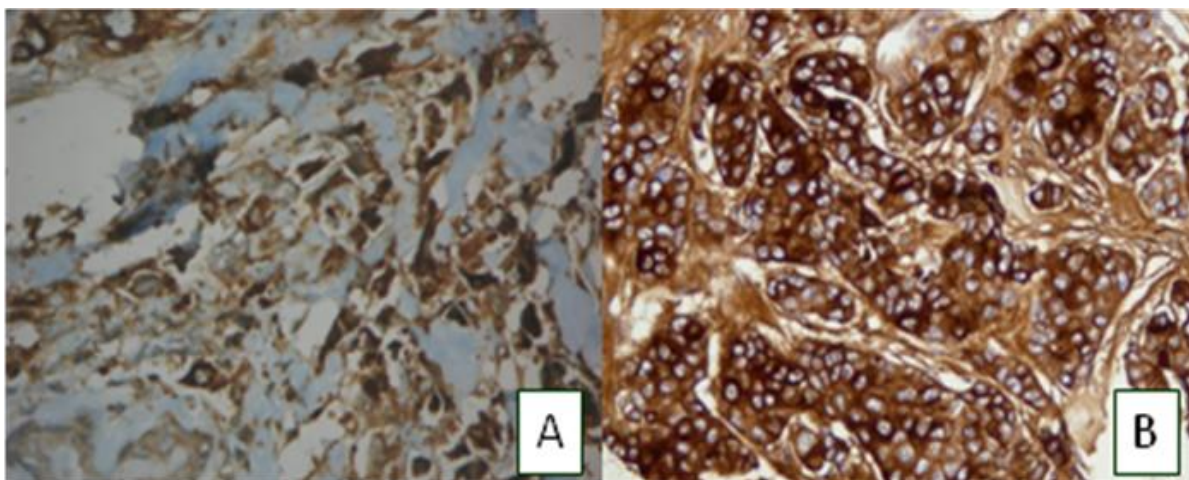


Figura 6. Imuno-histoquímica positiva (citoplasmática) em carcinoma ductal de mama para mammaglobin (A) e GCDFP-15 (B).

Napsin A (tabela 7) foi positivo em 8 sobre 31 (26%) carcinomas de pulmão escamosos, em 37 sobre 40 adenocarcinomas de pulmão (93%), em somente 1 de 18 carcinomas pulmonares de células pequenas (6%), em 7 sobre 12 carcinomas pulmonares de células grandes (58%) e em 5 sobre 15 carcinóides pulmonares (33%). Porém também foi positivo em vários outros órgãos: rim (35/52=67%), neoplasia endócrina pancreática (1/7=14%), carcinóide gastrointestinal (9/13=69%), estômago (1/14=7%), carcinoma de tireóide (34/53=64%), carcinoma espinocelular (2/26=8%), escamoso anogenital (3/46=7%), escamoso de cabeça e pescoço (2/41=5%), adenocarcinoma de pâncreas (6/42=14%), de próstata (23/38=61%), carcinoma urotelial (3/72=4%), carcinoma hepatocelular (8/13=62%), colangiocarcinoma (1/10=10%), carcinoma cólon-retal (2/70=3%), de glândula salivar (3/15=20%), mama(10/79=13%), endométrio (4/39=10%), e de ovário (7/44=16%).

Tabela 7 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Napsin A em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

Napsin A	+	-	e	Total		%
Pulmão Escamoso	8	23	3	34	31	26%
Pulmão Outros	50	35	5	90	85	59%
Rim	35	17	0	52	52	67%
PEN (Pâncreas endócrino)	1	6	0	7	7	14%
Carcinóide gastrointestinal	9	4	0	13	13	69%
Estômago	1	13	2	16	14	7%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	20	5	25	20	0%
Tireóide	34	19	4	57	53	64%
Escamoso pele	2	24	8	34	26	8%
Escamoso anogenital	3	43	8	54	46	7%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	2	39	10	51	41	5%
Pâncreas (Exócrino)	6	36	6	48	42	14%
Próstata	23	15	5	43	38	61%
Carcinoma Urotelial	3	69	3	75	72	4%
Hepatoma	8	5	1	14	13	62%
Colangiocarcinoma	1	9	1	11	10	10%
Cólon-retal	2	68	10	80	70	3%
Glândula Salivar	3	12	0	15	15	20%
Mama	10	69	7	86	79	13%
Endométrio	4	35	1	40	39	10%
Ovário	7	37	1	45	44	16%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

PAP (tabela 8), embora positivo em 95% dos carcinomas de próstata, foi também positivo em carcinóide gastrointestinal (25%), tireóide (20%), carcinoma cólon-retal (19%), carcinoma hepatocelular (18%), carcinoma de ovário (17%), carcinoma urotelial (6%), de endométrio (5%), e renal (2%).

Tabela 8 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo PAP em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

PAP	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	29	5	34	29	0%
Pulmão Outros	0	84	6	90	84	0%
Rim	1	51	0	52	52	2%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	6	1	7	6	0%
Carcinóide gastrointestinal	3	9	1	13	12	25%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	20	5	25	20	0%
Tireóide	8	32	17	57	40	20%
Escamoso pele	0	27	7	34	27	0%
Escamoso anogenital	0	42	12	54	42	0%
Escamoso esôfago	0	7	3	10	7	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	41	10	51	41	0%
Pâncreas (Exócrino)	0	43	5	48	43	0%
Próstata	37	2	4	43	39	95%
Carcinoma Urotelial	4	63	8	75	67	6%
Hepatoma	2	9	3	14	11	18%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	12	51	17	80	63	19%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	0	75	11	86	75	0%
Endométrio	2	38	0	40	40	5%
Ovário	7	35	3	45	42	17%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Já PSA (tabela 9) além de ser positivo em 97% dos casos de próstata (38 casos positivos num total de 39 casos), nos carcinomas de outros órgãos foi positivo em somente 1% (10 casos num total de 761), sendo esses 2 carcinomas renais (1 de células claras e 1 papilar), 2 adenocarcinomas de pulmão, 1 carcinoma folicular de tireóide, 1 carcinoma urotelial de bexiga, 1 carcinoma endometrióide de ovário, e 3 carcinomas de mama (2 ductais e 1 lobular).

Tabela 9 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo PSA em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

PSA	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	29	5	34	29	0%
Pulmão Outros	2	82	6	90	84	2%
Rim	2	50	0	52	52	4%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	6	1	7	6	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	12	1	13	12	0%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	21	4	25	21	0%
Tireóide	1	45	11	57	46	2%
Escamoso pele	0	27	7	34	27	0%
Escamoso anogenital	0	43	11	54	43	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	42	9	51	42	0%
Pâncreas (Exócrino)	0	43	5	48	43	0%
Próstata	38	1	4	43	39	97%
Carcinoma Urotelial	1	69	5	75	70	1%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	0	63	17	80	63	0%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	3	74	9	86	77	4%
Endométrio	0	40	0	40	40	0%
Ovário	1	42	2	45	43	2%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Pax-2 (figura 7) foi positivo em 65% dos carcinomas renais (64% dos carcinomas de células claras, 76% dos carcinomas papilares, e em 50% dos carcinomas cromóforos). Nos outros carcinomas, o Pax-2 (tabela 10) foi positivo em 48 casos (6%) num total de 756 casos de carcinoma não-renal. Esses 48 casos incluem carcinoma de tireóide (9%), carcinoma escamoso de esôfago (13%), de

cabeça e pescoço (9%), e anogenital (5%), colangiocarcinoma (11%), adenocarcinoma de pâncreas (5%), carcinoma urotelial (3%), glândula salivar (7%), mama (6%), carcinoma de endométrio (46%) e de ovário (19%).

Tabela 10 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Pax-2 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

Pax-2	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	30	4	34	30	0%
Pulmão Outros	0	83	7	90	83	0%
Rim	34	18	0	52	52	65%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	7	0	7	7	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	20	5	25	20	0%
Tireóide	4	41	12	57	45	9%
Escamoso pele	0	28	6	34	28	0%
Escamoso anogenital	2	42	10	54	44	5%
Escamoso esôfago	1	7	2	10	8	13%
Escamoso Cabeça e Pescoço	4	39	8	51	43	9%
Pâncreas (Exócrino)	2	42	4	48	44	5%
Próstata	0	38	5	43	38	0%
Carcinoma Urotelial	2	69	4	75	71	3%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	1	8	2	11	9	11%
Cólon-retal	0	67	13	80	67	0%
Glândula Salivar	1	14	0	15	15	7%
Mama	5	75	6	86	80	6%
Endométrio	18	21	1	40	39	46%
Ovário	8	35	2	45	43	19%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

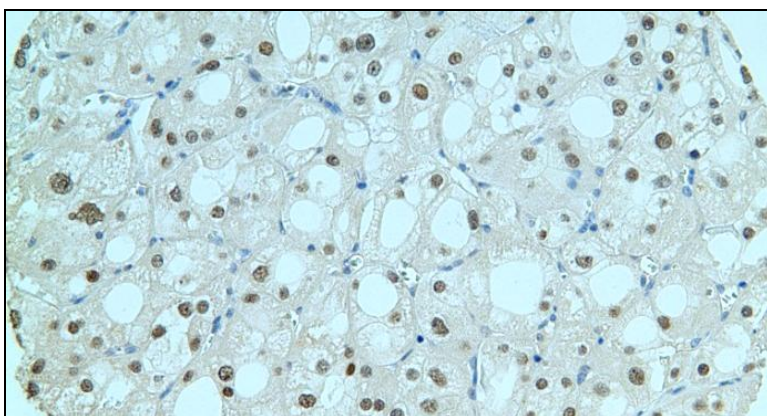


Figura 7. Imuno-histoquímica positiva para Pax-2 (nuclear) em carcinoma de células renais do tipo células claras.

RCC (tabela 11) foi positivo em 56% dos carcinomas renais (48% dos carcinomas de células claras, 94% dos carcinomas papilares e 10% dos carcinomas cromóforos).

Quanto aos outros órgãos, RCC teve positividade em 57 casos num total de 773 (7%); incluindo positividade em carcinoma de tireóide (35%), colangiocarcinoma (10%), mama (36%), ovário (14%), e carcinomas não escamosos de pulmão (5%).

Tabela 11 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo RCC em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

RCC	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	32	2	34	32	0%
Pulmão Outros	4	81	5	90	85	5%
Rim	29	23	0	52	52	56%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	7	0	7	7	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gástrica	0	19	6	25	19	0%
Tireóide	18	34	5	57	52	35%
Escamoso pele	0	25	9	34	25	0%
Escamoso anogenital	0	45	9	54	45	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	42	9	51	42	0%
Pâncreas (Exócrino)	0	45	3	48	45	0%
Próstata	0	38	5	43	38	0%
Carcinoma Urotelial	0	71	4	75	71	0%
Hepatoma	0	14	0	14	14	0%
Colangiocarcinoma	1	9	1	11	10	10%
Cólon-retal	0	74	6	80	74	0%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	28	49	9	86	77	36%
Endométrio	0	39	1	40	39	0%
Ovário	6	38	1	45	44	14%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

O receptor de estrogênio (ER) foi positivo em 89% dos carcinomas de mama, 80% dos carcinomas de endométrio, e 84% dos carcinomas de ovário (tabela 12). Quanto a outros órgãos, foi positivo em 20% dos carcinomas não escamosos de pulmão, 6% dos carcinomas renais, 50% dos carcinóides gastrointestinais, 20% dos carcinomas de tireóide, 15% dos carcinomas espinocelulares, 16% dos carcinomas escamosos anogenitais, 14% dos carcinomas escamosos de cabeça e pescoço, 5% dos carcinomas de próstata, e 3% dos carcinomas uroteliais.

Tabela 12 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo ER (Receptor de estrogênio) em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

ER	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	29	5	34	29	0%
Pulmão Outros	17	66	7	90	83	20%
Rim	3	48	1	52	51	6%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	6	1	7	6	0%
Carcinóide gastrointestinal	6	6	1	13	12	50%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	21	4	25	21	0%
Tireóide	8	32	17	57	40	20%
Escamoso pele	4	22	8	34	26	15%
Escamoso anogenital	7	36	11	54	43	16%
Escamoso esôfago	0	8	2	10	8	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	6	37	8	51	43	14%
Pâncreas (Exócrino)	0	40	8	48	40	0%
Próstata	2	36	5	43	38	5%
Carcinoma Urotelial	2	68	5	75	70	3%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	0	9	2	11	9	0%
Cólon-retal	0	58	22	80	58	0%
Glândula Salivar	0	14	1	15	14	0%
Mama	66	8	12	86	74	89%
Endométrio	32	8	0	40	40	80%
Ovário	36	7	2	45	43	84%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

O receptor de progesterona (PR) (tabela 13) foi positivo em 63% dos carcinomas de mama, 97% dos carcinomas de endométrio, 86% dos carcinomas de ovário, e 67% dos carcinomas de endocérvice. Porém, teve positividade em vários outros órgãos: carcinomas de pulmão escamosos (29%) e não escamosos (37%), carcinomas renais (24%), PEN (40%), carcinóide gastrointestinal (17%), adenocarcinoma de estômago (8%), de esôfago e junção esôfago-gástrica (15%), carcinoma de tireóide (41%), adenocarcinoma de pâncreas (11%), de próstata (5%), carcinoma urotelial (4%), de glândula salivar (7%), e carcinomas escamosos de pele (48%), anogenital (46%), de esôfago (22%) e de cabeça e pescoço (51%).

Tabela 13 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo PR (Receptor de progesterona) em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

PR	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	8	20	6	34	28	29%
Pulmão Outros	29	49	12	90	78	37%
Rim	12	39	1	52	51	24%
PEN (Pâncreas endócrino)	2	3	2	7	5	40%
Carcinóide gastrointestinal	2	10	1	13	12	17%
Estômago	1	12	3	16	13	8%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	3	17	5	25	20	15%
Tireóide	17	24	16	57	41	41%
Escamoso pele	12	13	9	34	25	48%
Escamoso anogenital	19	22	13	54	41	46%
Escamoso esôfago	2	7	1	10	9	22%
Escamoso Cabeça e Pescoço	21	20	10	51	41	51%
Pâncreas (Exócrino)	4	34	10	48	38	11%
Próstata	2	36	5	43	38	5%
Carcinoma Urotelial	3	67	5	75	70	4%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	0	63	17	80	63	0%
Glândula Salivar	1	13	1	15	14	7%
Mama	45	27	14	86	72	63%
Endométrio	36	1	3	40	37	97%
Ovário	36	6	3	45	42	86%
Endocérvice	2	1	1	4	3	67%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Tireoglobulina (tabela 14) foi positiva em 95% dos carcinomas de tireóide (38 positivos num total de 40 casos). Os dois carcinomas de tireóide negativos foram anaplásicos (que sabidamente, podem perder a expressão de tireoglobulina). Dos carcinomas de outros órgãos, de 737 carcinomas testados, só teve expressão aberrante em 1 carcinoma (de cólon-reto), sendo negativa em todos os outros.

Tabela 14 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Tireoglobulina em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

Tireoglobulina	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	30	4	34	30	0%
Pulmão Outros	0	81	9	90	81	0%
Rim	0	51	1	52	51	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	5	2	7	5	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	18	7	25	18	0%
Tireóide	38	2	17	57	40	95%
Escamoso pele	0	24	10	34	24	0%
Escamoso anogenital	0	41	13	54	41	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	41	10	51	41	0%
Pâncreas (Exócrino)	0	42	6	48	42	0%
Próstata	0	39	4	43	39	0%
Carcinoma Urotelial	0	70	5	75	70	0%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	1	62	17	80	63	2%
Glândula Salivar	0	14	1	15	14	0%
Mama	0	76	10	86	76	0%
Endométrio	0	39	1	40	39	0%
Ovário	0	42	3	45	42	0%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

TTF-1 (figura 8) foi positivo em 93% dos carcinomas de tireóide, 3% dos carcinomas escamosos de pulmão, e 77% dos carcinomas de pulmão não escamosos (tabela 15). De todos os outros órgãos, houve expressão aberrante em somente uma neoplasia pancreática endócrina.

Tabela 15 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo TTF-1 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

TTF-1	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	1	30	3	34	31	3%
Pulmão Outros	65	19	6	90	84	77%
Rim	0	52	0	52	52	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	1	5	1	7	6	17%
Carcinóide gastrointestinal	0	12	1	13	12	0%
Estômago	0	13	3	16	13	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	21	4	25	21	0%
Tireóide	38	3	16	57	41	93%
Escamoso pele	0	26	8	34	26	0%
Escamoso anogenital	0	49	5	54	49	0%
Escamoso esôfago	0	8	2	10	8	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	41	10	51	41	0%
Pâncreas (Exócrino)	0	36	12	48	36	0%
Próstata	0	38	5	43	38	0%
Carcinoma Urotelial	0	69	6	75	69	0%
Hepatoma	0	11	3	14	11	0%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	0	63	17	80	63	0%
Glândula Salivar	0	14	1	15	14	0%
Mama	0	72	14	86	72	0%
Endométrio	0	40	0	40	40	0%
Ovário	0	42	3	45	42	0%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

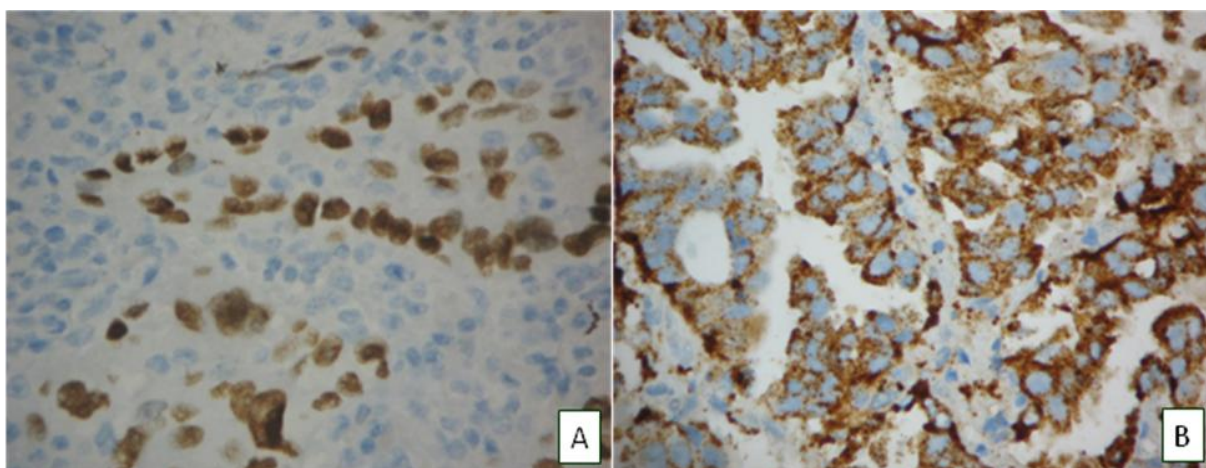


Figura 8. Imuno-histoquímica positiva em adenocarcinoma de pulmão A: TTF-1. (nuclear) B : Napsin A (granular citoplasmática)

Uroplakin III (tabela 16) foi positivo em 87% dos carcinomas uroteliais. No total dos carcinomas não-uroteliais, uroplakin III foi positivo em 99 de 747 casos (13%). Esses 99 de 747 casos estão assim distribuídos: 1/73 (1%) caso de carcinoma não-escamoso de pulmão, 1/51 (2%) caso de carcinoma renal, 1/7 (14%) caso de neoplasia endócrina pancreática, 16/50 (32%) casos de carcinoma de tireóide, 2/30 (7%) casos de carcinoma espinocelular, 1/43 (2%) casos de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, 10/44 (23%) casos de adenocarcinoma de pâncreas, 10/12 (83%) casos de carcinomas hepatocelulares, 8/9 (89%) casos de colangiocarcinomas, 18/69 (26%) casos de carcinoma de cólon-reto, 5/15 (33%) casos de carcinoma de glândulas salivares, 6/81 (7%) casos de carcinoma de mama, 9/39 (23%) casos de carcinoma de endométrio, 9/44 (20%) casos de carcinoma de ovário, e 2/3 (67%) casos de carcinoma de endocérvice.

Tabela 16 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Uroplakin III em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

Uroplakin III	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	32	2	34	32	0%
Pulmão Outros	1	72	17	90	73	1%
Rim	1	50	1	52	51	2%
PEN (Pâncreas endócrino)	1	6	0	7	7	14%
Carcinóide gastrointestinal	0	12	1	13	12	0%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	23	2	25	23	0%
Tireóide	16	34	7	57	50	32%
Escamoso pele	2	28	4	34	30	7%
Escamoso anogenital	0	48	6	54	48	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	1	42	8	51	43	2%
Pâncreas (Exócrino)	10	34	4	48	44	23%
Próstata	0	39	4	43	39	0%
Carcinoma Urotelial	61	9	5	75	70	87%
Hepatoma	10	2	2	14	12	83%
Colangiocarcinoma	8	1	2	11	9	89%
Cólon-retal	18	51	11	80	69	26%
Glândula Salivar	5	10	0	15	15	33%
Mama	6	75	5	86	81	7%
Endométrio	9	30	1	40	39	23%
Ovário	9	35	1	45	44	20%
Endocérvice	2	1	1	4	3	67%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Villin (figura 9) foi positivo em quase todos (94%) os carcinomas de cólon-reto (tabela 17). Quanto aos outros sítios, também foi um bom marcador para carcinóide gastrointestinal (77%), para adenocarcinoma de estômago (64%), e adenocarcinoma de esôfago e de junção esôfago-gástrica (76%).

Nos outros órgãos villin teve expressão aberrante em carcinomas de endocérvice (67%), carcinomas não escamosos de pulmão (8%), rim (4%), PEN (17%), adenocarcinoma de pâncreas (32%), carcinoma urotelial (1%), hepatoma (8%), colangiocarcinoma (67%), endométrio (10%), e ovário (9%). Os 7 carcinomas não escamosos de pulmão em que villin foi positivo foram 4 adenocarcinomas e 3 carcinóides.

Tabela 17 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Villin em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

Villin	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	29	5	34	29	0%
Pulmão Outros	7	78	5	90	85	8%
Rim	2	50	0	52	52	4%
PEN (Pâncreas endócrino)	1	5	1	7	6	17%
Carcinóide gastrointestinal	10	3	0	13	13	77%
Estômago	9	5	2	16	14	64%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	16	5	4	25	21	76%
Tireóide	0	44	13	57	44	0%
Escamoso pele	0	27	7	34	27	0%
Escamoso anogenital	0	47	7	54	47	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	43	8	51	43	0%
Pâncreas (Exócrino)	13	28	7	48	41	32%
Próstata	0	39	4	43	39	0%
Carcinoma Urotelial	1	70	4	75	71	1%
Hepatoma	1	12	1	14	13	8%
Colangiocarcinoma	6	3	2	11	9	67%
Cólon-retal	58	4	18	80	62	94%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	0	78	8	86	78	0%
Endométrio	4	35	1	40	39	10%
Ovário	4	39	2	45	43	9%
Endocérvice	2	1	1	4	3	67%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

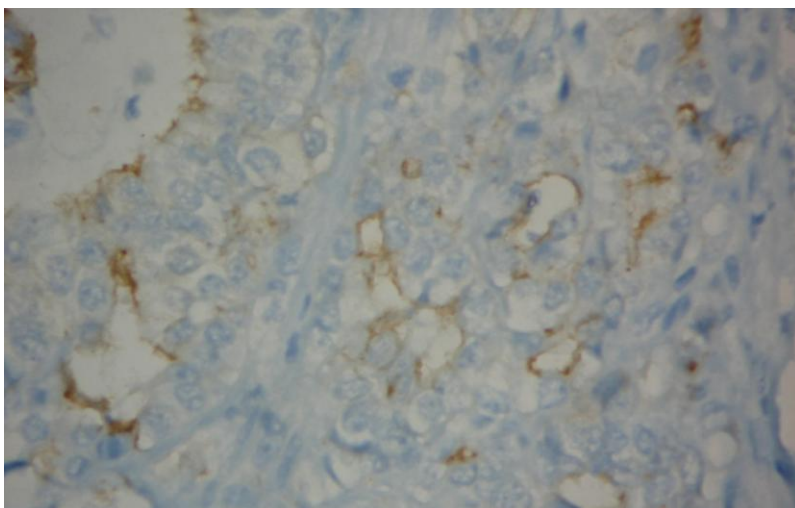


Figura 9. Imuno-histoquímica positiva para villin (membranosa) em adenocarcinoma de estômago.

WT1 (figura 10) foi positivo em 26 de 44 casos (59%) casos de carcinoma de ovário (tabela 18). Separando os carcinomas de ovário por tipos histológicos, WT1 foi positivo em 20/23 (87%) serosos, 0/7 (0%) mucinosos, 1/5 (20%) endometrióides, 3/4 (75%) carcinomas pouco diferenciados, e 1/1 (100%) tumor maligno misto Mülleriano. Nos outros órgãos teve baixa positividade, como 13% em glândula salivar, 10% em mama (8 casos positivos num total de 79 casos, sendo que os positivos foram 7 ductais e 1 mucinoso), 1% em carcinomas não escamosos de pulmão, 3% em próstata, e 3/38 casos (8%) em endométrio. Esses 3 casos de endométrio que foram positivos foram 2 tumores malignos mistos Müllerianos e um carcinoma indiferenciado. Nenhum dos carcinomas endometriais serosos (0/5), endometrióides (0/25), ou de células claras (0/3) foi positivo para WT1.

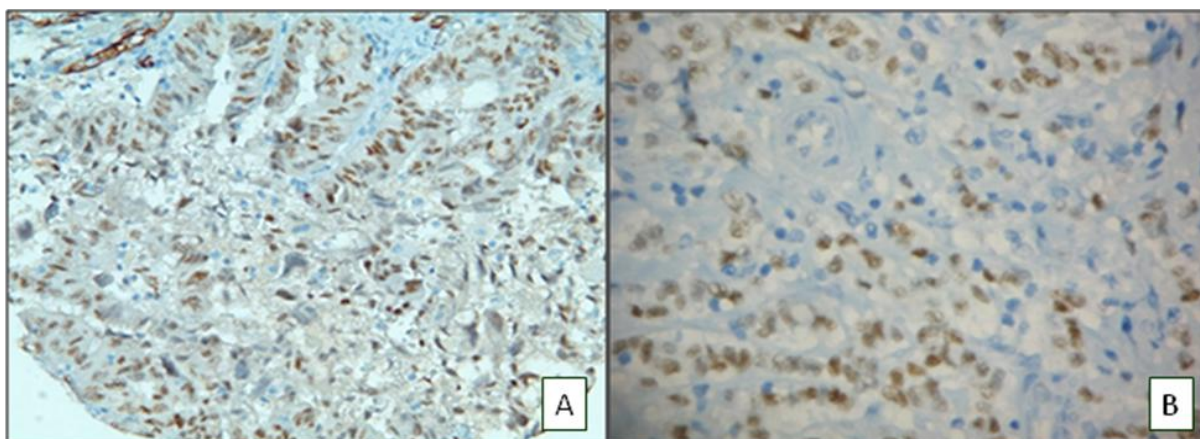


Figura 10. Imuno-histoquímica positiva (nuclear) em carcinoma de ovário para WT1 (A) e em carcinoma lobular de mama para receptor de estrogênio (B)

Tabela 18 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo WT-1 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

WT1	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	29	5	34	29	0%
Pulmão Outros	1	82	7	90	83	1%
Rim	0	52	0	52	52	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	7	0	7	7	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	0	14	2	16	14	0%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	0	20	5	25	20	0%
Tireóide	0	53	4	57	53	0%
Escamoso pele	0	27	7	34	27	0%
Escamoso anogenital	0	44	10	54	44	0%
Escamoso esôfago	0	7	3	10	7	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	40	11	51	40	0%
Pâncreas (Exócrino)	0	45	3	48	45	0%
Próstata	1	36	6	43	37	3%
Carcinoma Urotelial	0	71	4	75	71	0%
Hepatoma	0	14	0	14	14	0%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	0	77	3	80	77	0%
Glândula Salivar	2	13	0	15	15	13%
Mama	8	71	7	86	79	10%
Endométrio	3	35	2	40	38	8%
Ovário	26	18	1	45	44	59%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

CK7 (tabela 19) demonstrou positividade acima de 85% em adenocarcinoma de estômago, esôfago, junção esôfago-gástrica, tireóide, pâncreas, carcinoma urotelial, colangiocarcinoma, glândula salivar, mama, endométrio, ovário e endocérvice. Entre os carcinomas não escamosos de pulmão, CK7 foi positivo em 80%, porém desmembrando por tipo histológico foi positivo em 100% dos adenocarcinomas de pulmão, 56% dos carcinomas de células pequenas, 91% dos carcinomas de células grandes, e 47% dos carcinóides. Entre os carcinomas escamosos de diversos sítios, a positividade de CK7 variou entre 13 a 38%. Nos carcinomas de células renais CK7 foi positivo em 26 num total de 51 casos incluídos (51%). Desmembrando os carcinomas de células renais por tipo histológico, a positividade de CK7 foi de 7 sobre 25 casos (28%) nos carcinomas renais de células claras, 13/16 (81%) nos carcinomas renais do tipo papilar, e 6/10 nos carcinomas

renais tipo cromóforo. E em outros órgãos a positividade variou de baixa a intermediária: PEN (33%), carcinóide gastrointestinal (15%), próstata (18%), e hepatoma 23%. Em carcinomas de cólon-reto foi positivo em 13%, porém é importante desmembrar para notar que CK7 não foi positivo em nenhum dos carcinomas de cólon analisados (0/36, 0%), e foi positivo em 30% dos carcinomas de reto (8 casos positivos sobre um total de 26%).

Tabela 19 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CK7 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

CK7	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	11	18	5	34	29	38%
Pulmão Outros	66	17	7	90	83	80%
Rim	26	25	1	52	51	51%
PEN (Pâncreas endócrino)	2	4	1	7	6	33%
Carcinóide gastrointestinal	2	11	0	13	13	15%
Estômago	12	2	2	16	14	86%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gástrica	20	1	4	25	21	95%
Tireóide	40	3	14	57	43	93%
Escamoso pele	7	19	8	34	26	27%
Escamoso anogenital	15	32	7	54	47	32%
Escamoso esôfago	1	7	2	10	8	13%
Escamoso Cabeça e Pescoço	13	27	11	51	40	33%
Pâncreas (Exócrino)	41	1	6	48	42	98%
Próstata	7	31	5	43	38	18%
Carcinoma Urotelial	61	9	5	75	70	87%
Hepatoma	3	10	1	14	13	23%
Colangiocarcinoma	10	0	1	11	10	100%
Cólon-retal	8	54	18	80	62	13%
Glândula Salivar	14	1	0	15	15	93%
Mama	75	3	8	86	78	96%
Endométrio	34	5	1	40	39	87%
Ovário	42	0	3	45	42	100%
Endocérvice	3	0	1	4	3	100%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

CK20 (tabela 20) foi positivo em 94% dos carcinomas cólon-retais (94% dos carcinomas de cólon e 93% dos carcinomas de reto), 49% dos carcinomas uroteliais, 38% dos colangiocarcinomas, 11% dos adenocarcinomas de pâncreas, e 21% dos adenocarcinomas de estômago, esôfago e junção esôfago-gástrica. Nos tumores de ovário foi positivo em 7%, porém eles foram todos carcinomas mucinosos. CK20 foi positivo em 3 de 7 carcinomas mucinosos de ovário e foi negativo em todos os outros tipos histológicos de carcinoma de ovário. Em todos os outros órgãos, CK 20 foi negativo ou foi positivo em um mínimo de casos.

Tabela 20 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo CK20 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

CK20	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	1	30	3	34	31	3%
Pulmão Outros	2	82	6	90	84	2%
Rim	1	50	1	52	51	2%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	7	0	7	7	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	13	0	13	13	0%
Estômago	3	11	2	16	14	21%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	4	15	6	25	19	21%
Tireóide	0	43	14	57	43	0%
Escamoso pele	0	27	7	34	27	0%
Escamoso anogenital	0	50	4	54	50	0%
Escamoso esôfago	0	9	1	10	9	0%
Escamoso Cabeça e Pescoço	0	41	10	51	41	0%
Pâncreas (Exócrino)	5	40	3	48	45	11%
Próstata	0	39	4	43	39	0%
Carcinoma Urotelial	35	36	4	75	71	49%
Hepatoma	0	12	2	14	12	0%
Colangiocarcinoma	3	5	3	11	8	38%
Cólon-retal	58	4	18	80	62	94%
Glândula Salivar	0	15	0	15	15	0%
Mama	1	78	7	86	79	1%
Endométrio	0	39	1	40	39	0%
Ovário	3	39	3	45	42	7%
Endocérvice	0	3	1	4	3	0%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

K903 (tabela 21) demonstrou positividade de 100% em todos os carcinomas escamosos. Porém também demonstrou positividade considerável em vários tumores não escamosos, tais como: outros carcinomas de pulmão (35%), rim (12%), estômago (50%), adenocarcinoma de esôfago e JEG (63%), tireóide (52%), adenocarcinoma de pâncreas (95%), carcinoma urotelial (89%), colangiocarcinoma (30%), cólon-retal (16%), glândula salivar (93%), mama (72%), endométrio (64%), ovário (61%), e endocérvice (67%).

Tabela 21 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo K903 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

K903	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	30	0	4	34	30	100%
Pulmão Outros	26	49	15	90	75	35%
Rim	6	46	0	52	52	12%
PEN (Pâncreas endócrino)	0	7	0	7	7	0%
Carcinóide gastrointestinal	0	12	1	13	12	0%
Estômago	7	7	2	16	14	50%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	12	7	6	25	19	63%
Tireóide	27	25	5	57	52	52%
Escamoso pele	26	0	8	34	26	100%
Escamoso anogenital	48	0	6	54	48	100%
Escamoso esôfago	9	0	1	10	9	100%
Escamoso Cabeça e Pescoço	42	0	9	51	42	100%
Pâncreas (Exócrino)	41	2	5	48	43	95%
Próstata	0	38	5	43	38	0%
Carcinoma Urotelial	64	8	3	75	72	89%
Hepatoma	0	13	1	14	13	0%
Colangiocarcinoma	3	7	1	11	10	30%
Cólon-retal	11	59	10	80	70	16%
Glândula Salivar	14	1	0	15	15	93%
Mama	57	22	7	86	79	72%
Endométrio	25	14	1	40	39	64%
Ovário	27	17	1	45	44	61%
Endocérvice	2	1	1	4	3	67%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

p16 teve positividade muito variável nos adenocarcinomas (tabela 22). Porém nos escamosos foi negativo em todos os carcinomas escamosos de pulmão, e teve positividade baixa a intermediária em carcinomas escamosos de outros sítios: anogenital (45%), cabeça e pescoço (24%), pele (28%) ou esôfago (33%). Dentre os carcinomas não escamosos de pulmão p16 foi positivo em 6/76 casos (3/35 adenocarcinomas, 2/17 carcinomas de células pequenas e 1/10 carcinoma de células grandes).

Tabela 22 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo p16 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

p16	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	0	30	4	34	30	0%
Pulmão Outros	6	70	14	90	76	8%
Rim	0	51	1	52	51	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	1	6	0	7	7	14%
Carcinóide gastrointestinal	2	10	1	13	12	17%
Estômago	1	13	2	16	14	7%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gástrica	3	17	5	25	20	15%
Tireóide	8	44	5	57	52	15%
Escamoso pele	7	18	9	34	25	28%
Escamoso anogenital	22	27	5	54	49	45%
Escamoso esôfago	3	6	1	10	9	33%
Escamoso Cabeça e Pescoço	10	31	10	51	41	24%
Pâncreas (Exócrino)	7	36	5	48	43	16%
Próstata	8	30	5	43	38	21%
Carcinoma Urotelial	31	41	3	75	72	43%
Hepatoma	0	13	1	14	13	0%
Colangiocarcinoma	2	8	1	11	10	20%
Cólon-retal	28	46	6	80	74	38%
Glândula Salivar	11	4	0	15	15	73%
Mama	24	52	10	86	76	32%
Endométrio	20	18	2	40	38	53%
Ovário	28	16	1	45	44	64%
Endocérvice	3	0	1	4	3	100%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

p63 (tabela 23), assim como a K903, também foi positivo em 100% dos carcinomas escamosos. Porém, diferente da K903 ele teve positividade elevada nos não escamosos em somente carcinoma urotelial (83%), glândula salivar (67%), e endocérvice (50%). Teve baixa positividade em outros órgãos não escamosos, mas numa percentagem bem menor que K903.

Tabela 23 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo p63 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

p63	+	-	e	Total		%
Pulmão Escamoso	32	0	2	34	32	100%
Pulmão Outros	23	53	14	90	76	30%
Rim	0	46	6	52	46	0%
PEN (Pâncreas endócrino)	1	6	0	7	7	14%
Carcinóide gastrointestinal	0	12	1	13	12	0%
Estômago	2	12	2	16	14	14%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	1	19	5	25	20	5%
Tireóide	14	37	6	57	51	27%
Escamoso pele	17	0	17	34	17	100%
Escamoso anogenital	48	0	6	54	48	100%
Escamoso esôfago	8	0	2	10	8	100%
Escamoso Cabeça e Pescoço	38	0	13	51	38	100%
Pâncreas (Exócrino)	12	29	7	48	41	29%
Próstata	0	37	6	43	37	0%
Carcinoma Urotelial	60	12	3	75	72	83%
Hepatoma	0	13	1	14	13	0%
Colangiocarcinoma	0	10	1	11	10	0%
Cólon-retal	0	76	4	80	76	0%
Glândula Salivar	10	5	0	15	15	67%
Mama	2	75	9	86	77	3%
Endométrio	7	32	1	40	39	18%
Ovário	3	41	1	45	44	7%
Endocérvice	2	2	0	4	4	50%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

AE1/AE3 (figura 11) foi positivo em 100% de vários carcinomas (tabela 24), e foi positivo em mais de 90% de quase todos os carcinomas, à exceção de carcinomas renais (positivo em 83% dos casos), e carcinomas hepatocelulares, o único em que teve baixa positividade (5 positivos entre 13 carcinomas hepatocelulares analisados, resultando em 38% de positividade).

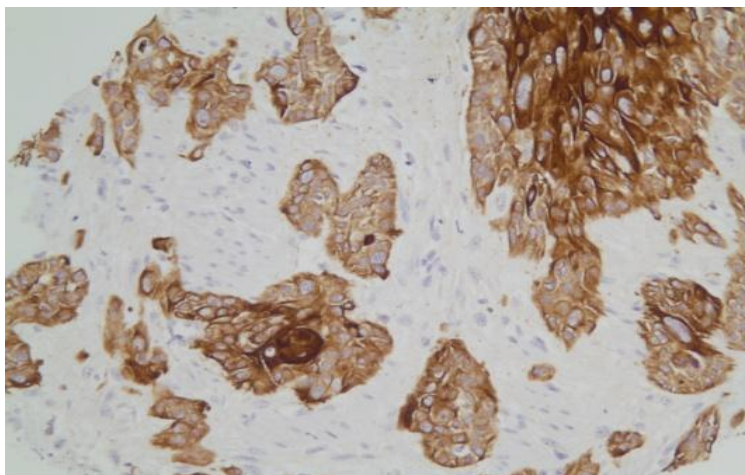


Figura 11. Imuno-histoquímica positiva para AE1/AE3 em carcinoma escamoso.

Tabela 24 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo AE1/AE3 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

AE1/AE3	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	30	0	4	34	30	100%
Pulmão Outros	77	2	11	90	79	97%
Rim	43	9	0	52	52	83%
PEN (Pâncreas endócrino)	6	0	1	7	6	100%
Carcinóide gastrointestinal	12	1	0	13	13	92%
Estômago	14	0	2	16	14	100%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	21	0	4	25	21	100%
Tireóide	45	3	9	57	48	94%
Escamoso pele	27	0	7	34	27	100%
Escamoso anogenital	44	0	10	54	44	100%
Escamoso esôfago	8	0	2	10	8	100%
Escamoso Cabeça e Pescoço	43	0	8	51	43	100%
Pâncreas (Exócrino)	42	0	6	48	42	100%
Próstata	37	1	5	43	38	97%
Carcinoma Urotelial	72	0	3	75	72	100%
Hepatoma	5	8	1	14	13	38%
Colangiocarcinoma	10	0	1	11	10	100%
Cólon-retal	70	0	10	80	70	100%
Glândula Salivar	15	0	0	15	15	100%
Mama	80	0	6	86	80	100%
Endométrio	37	2	1	40	39	95%
Ovário	44	0	1	45	44	100%
Endocérvice	3	0	1	4	3	100%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

Cam5.2 (tabela 25), teve positividade mais baixa que a da AE1/AE3 nos carcinomas escamosos (como era de se esperar pois a Cam5.2 é uma combinação de queratinas de baixo peso molecular). Nos carcinomas não escamosos, porém, Cam 5.2 foi positivo em 77% dos carcinomas hepatocelulares, 80% dos carcinomas de glândula salivar, e em mais de 90% de todos os outros.

Tabela 25 - Distribuição de frequência dos resultados imuno-histoquímicos do anticorpo Cam5.2 em carcinomas primários de diferentes órgãos obtidos com o método de *Tissue microarray*

CAM 5.2	+	-	e	Total	Incl.	%
Pulmão Escamoso	28	2	4	34	30	93%
Pulmão Outros	83	1	6	90	84	99%
Rim	49	3	0	52	52	94%
PEN (Pâncreas endócrino)	6	0	1	7	6	100%
Carcinóide gastrointestinal	12	1	0	13	13	92%
Estômago	14	0	2	16	14	100%
Adeno esôfago e Junção esôfago-gastrica	21	0	4	25	21	100%
Tireóide	43	2	12	57	45	96%
Escamoso pele	4	23	7	34	27	15%
Escamoso anogenital	13	33	8	54	46	28%
Escamoso esôfago	3	5	2	10	8	38%
Escamoso Cabeça e Pescoço	20	23	8	51	43	47%
Pâncreas (Exócrino)	45	0	3	48	45	100%
Próstata	35	3	5	43	38	92%
Carcinoma Urotelial	70	2	3	75	72	97%
Hepatoma	10	3	1	14	13	77%
Colangiocarcinoma	10	0	1	11	10	100%
Cólon-retal	63	0	17	80	63	100%
Glândula Salivar	12	3	0	15	15	80%
Mama	80	0	6	86	80	100%
Endométrio	38	1	1	40	39	97%
Ovário	43	0	2	45	43	100%
Endocérvice	3	0	1	4	3	100%

+ : Número de casos positivos

- : Número de casos negativos

e : Número de casos excluídos.

Total : Número de casos para cada órgão, consistindo da soma de positivos, negativos, e excluídos.

Incl. : Número de casos incluídos para cada órgão. Consiste da soma de casos positivos e negativos.

% : Percentagem de casos positivos para cada órgão, sem contar os casos excluídos. Ou seja, Percentagem = (Casos positivos/Casos incluídos) x 100%.

A tabela 26 mostra somente a percentagens de casos positivos, de forma a possibilitar a inclusão de todos os marcadores e todos os órgãos numa única tabela, facilitando a comparação. Cada célula da tabela foi colorida em diferentes tons variando de vermelho para 0%, passando por amarelo para percentagens intermediárias, até azul para 100%, para facilitar ainda mais a comparação visual.

Tabela 26 - Distribuição de percentagens de casos positivos dos resultados imunohistoquímicos obtidos com a utilização de todos os 24 anticorpos avaliados neste estudo em carcinomas primários de diferentes órgãos com o método de *Tissue microarray*

	AE1/3	CAM	K903	CK7	CK20	p63	p16	CK5/6	Uro	Hep1	PAP	PSA	CDX2	Villin	TTF1	Naps	RCC	Pax2	Tgbl	WT1	ER	PR	GCD	Mam
Pulmão Escamoso	100%	93%	100%	38%	3%	100%	0%	97%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	26%	0%	0%	0%	0%	0%	29%	41%	24%
Pulmão Outros	97%	99%	35%	80%	2%	30%	8%	6%	1%	16%	0%	2%	1%	8%	77%	59%	5%	0%	0%	1%	20%	37%	38%	24%
Rim	83%	94%	12%	51%	2%	0%	0%	0%	2%	2%	2%	4%	0%	4%	0%	67%	56%	65%	0%	0%	6%	24%	20%	59%
PEN	100%	100%	0%	33%	0%	14%	14%	0%	14%	0%	0%	0%	0%	17%	17%	14%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	29%	43%
GI Carcinóide	92%	92%	0%	15%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	25%	0%	62%	77%	0%	69%	0%	0%	0%	0%	50%	17%	8%	15%
Estômago	100%	100%	50%	86%	21%	14%	7%	23%	0%	21%	0%	0%	36%	64%	0%	7%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	21%	21%
Adeno esôfago e JEG	100%	100%	63%	95%	21%	5%	15%	5%	0%	21%	0%	0%	52%	76%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	15%	36%	48%
Tireóide	94%	96%	52%	93%	0%	27%	15%	4%	32%	0%	20%	2%	19%	0%	93%	64%	35%	9%	95%	0%	20%	41%	2%	55%
Escamoso pele	100%	15%	100%	27%	0%	100%	28%	100%	7%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	0%	0%	0%	0%	15%	48%	85%	12%
Escamoso anogenital	100%	28%	100%	32%	0%	100%	45%	100%	0%	0%	0%	0%	2%	0%	0%	7%	0%	5%	0%	0%	16%	46%	93%	22%
Escamoso esôfago	100%	38%	100%	13%	0%	100%	33%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	13%	0%	0%	0%	22%	50%	88%
Escamoso C&P	100%	47%	100%	33%	0%	100%	24%	100%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%	9%	0%	0%	14%	51%	77%	29%
Pâncreas (Exócrino)	100%	100%	95%	98%	11%	29%	16%	60%	23%	7%	0%	0%	7%	32%	0%	14%	0%	5%	0%	0%	0%	11%	0%	30%
Próstata	97%	92%	0%	18%	0%	0%	21%	0%	0%	5%	95%	97%	3%	0%	0%	61%	0%	0%	0%	3%	5%	5%	21%	61%
Carcinoma Urotelial	100%	97%	89%	87%	49%	83%	43%	60%	87%	0%	6%	1%	7%	1%	0%	4%	0%	3%	0%	0%	3%	4%	1%	12%
Hepatoma	38%	77%	0%	23%	0%	0%	0%	0%	83%	92%	18%	0%	0%	8%	0%	62%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	23%
Cholangiocarcinoma	100%	100%	30%	100%	38%	0%	20%	30%	89%	30%	0%	0%	22%	67%	0%	10%	10%	11%	0%	0%	0%	0%	10%	30%
Colo-retal	100%	100%	16%	13%	94%	0%	38%	14%	26%	6%	19%	0%	95%	94%	0%	3%	0%	0%	2%	0%	0%	0%	1%	37%
Glândula Salivar	100%	80%	93%	93%	0%	67%	73%	87%	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	0%	7%	0%	13%	0%	7%	27%	47%
Mama	100%	100%	72%	96%	1%	3%	32%	14%	7%	1%	0%	4%	0%	0%	0%	13%	36%	6%	0%	10%	89%	63%	67%	61%
Endométrio	95%	97%	64%	87%	0%	18%	53%	36%	23%	5%	5%	0%	15%	10%	0%	10%	0%	46%	0%	8%	80%	97%	0%	69%
Ovário	100%	100%	61%	100%	7%	7%	64%	33%	20%	9%	17%	2%	18%	9%	0%	16%	14%	19%	0%	59%	84%	86%	2%	52%
Endocérvix	100%	100%	67%	100%	0%	50%	100%	0%	67%	0%	0%	0%	0%	67%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	67%	0%	33%

As células foram coloridas numa escala progressiva começando com vermelho para 0%, passando por progressivos tons de laranja, amarelo, verde, e azul até chegar a 100%, conforme o exemplo da paleta seguinte:



7 DISCUSSÃO

AE1/AE3 demonstrou ser um excelente marcador para comprovar origem epitelial de um tumor pouco diferenciado, tendo baixa positividade somente nos carcinomas hepatocelulares (38%), similar a literatura. (17, 143) Teve 83% de positividade em rim, e teve positividade acima de 90% em todos os outros carcinomas.

Cam5.2 também é um marcador muito bom para comprovar origem epitelial, mas sua positividade foi bem mais baixa que a da AE1/AE3 nos carcinomas escamosos (como era de se esperar pois a Cam5.2 é uma combinação de queratinas de baixo peso molecular), e esses resultados foram de acordo com a literatura. (17) Cam 5.2 foi superior a AE1/AE3 na positividade dos carcinomas hepatocelulares, similar a literatura. (35, 143)

K903 teve alta positividade em carcinomas escamosos, adenocarcinoma de pâncreas, e carcinoma urotelial, semelhante a outros relatos. (113, 142) Porém, não deve ser incluída como único marcador epitelial para um painel de tumor indiferenciado, pois teve baixa positividade em vários tipos de tumores. Poderia ser incluída se aliada a Cam5.2, já que K903 marcaria carcinomas escamosos que poderiam ser negativos para Cam5.2. Entretanto, para a associação com Cam5.2, o AE1/AE3 é mais vantajoso que K903. Quanto à confirmação de diferenciação escamosa, K903 não foi muito específico, pois demonstrou positividade considerável em vários tumores não escamosos.

p63 foi um marcador escamoso muito mais específico, sendo positivo em 100% dos carcinomas escamosos, e tendo positividade elevada nos não escamosos em somente carcinoma urotelial (83%), glândula salivar (67%), e endocérvice (50%). Teve baixa positividade em outros órgãos não escamosos, mas numa percentagem bem menor que K903. Devido a alta percentagem de positividade em carcinomas uroteliais, pode também ser usada como marcador urotelial, em conjunto com CK5/6 e uroplakin III. (15, 26)

Tireoglobulina é o anticorpo sítio-específico modelo! Foi positivo em todos os carcinomas de tireóide com exceção dos anaplásicos (que sabidamente, podem

perder a expressão de tireoglobulina). Dos carcinomas de outros órgãos, de 737 carcinomas testados, só teve expressão aberrante em um carcinoma, sendo negativa em todos os outros. Nossos achados foram semelhantes aos da literatura. (15, 83, 144) O ideal seria que cada órgão tivesse o seu anticorpo sítio-específico tão perfeito quanto a tireoglobulina é para a tireóide.

PSA se aproxima desse objetivo em relação à próstata. Foi positivo em 97% dos casos de próstata (38/39), e nos carcinomas de outros órgãos foi positivo em somente 1% (10 casos num total de 761).

PAP, embora positivo em 95% dos carcinomas de próstata, teve especificidade inferior ao PSA, pois foi também positivo em carcinóide gastrointestinal (25%), tireóide (20%), carcinoma cólon-retal (19%), carcinoma hepatocelular (18%), carcinoma de ovário (17%), carcinoma urotelial (6%), de endométrio (5%), e renal (2%).

Essa alta sensibilidade de PSA e PAP para carcinoma de próstatas é consistente com a literatura. (15) Num estudo comparando carcinomas de próstata pouco diferenciados com carcinomas uroteliais de alto grau Kunju demonstrou 95% de positividade de ambos em carcinoma de próstata, e também demonstrou que PSA foi mais específico que PAP. (142) Entretanto, foi demonstrado que a percentagem de positividade para PSA e PAP diminui nos carcinomas de alto grau (145), e uma das limitações do nosso estudo foi que não avaliamos a expressão de acordo com a diferenciação.

TTF-1 comprovou ter excelente especificidade para pulmão e tireóide, sendo positivo em 93% dos carcinomas de tireóide, 3% dos carcinomas escamosos de pulmão, e 77% dos carcinomas de pulmão não escamosos. Quanto aos outros órgãos, de 626 carcinomas testados, houve expressão aberrante em somente um. Nossos achados sobre TTF-1 foram consistentes com a literatura. (58, 146-149)

O outro marcador sítio-específico para pulmão, Napsin A, foi bem inferior ao TTF-1 em especificidade, pois também foi positivo em vários outros órgãos. Em carcinoma de pulmão, Napsin A foi positivo em 8 sobre 31(26%) carcinomas de pulmão escamosos, e em 50 sobre 85 (59%) carcinomas de pulmão não escamosos. Nossos resultados foram diferentes de outros estudos que relataram Napsin A como altamente específica para carcinoma de pulmão. (57) No estudo de Ueno que incluiu um total de 118 carcinomas encontrados no pulmão sendo 16 metastáticos e 102 primários de diferentes tipos histológicos, Napsin A teve 84,6% de sensibilidade e

94,3% de especificidade. (57) No nosso estudo Napsin A foi encontrada positivo em vários tumores além do pulmão. Uma possível explicação para termos encontrado Napsin A positivo em vários outros tumores pode ser a amostra maior em nosso estudo. Um artigo de revisão sobre imuno-histoquímica para o diagnóstico de carcinomas primários e metastáticos de pulmão traz Napsin A como superior a TTF-1. (58) Nesse artigo, Jagirdar relata Napsin A como positivo em até 80% dos adenocarcinomas de pulmão e em somente 10% dos carcinomas de rim e de tireóide, e em menos de 5% de outros carcinomas. No nosso estudo, Napsin A foi positivo em 93% dos adenocarcinomas de pulmão, porém teve positividade importante em vários outros carcinomas: rim (67%), carcinóide gastrointestinal (69%), carcinoma de tireóide (64%), adenocarcinoma de próstata (61%), carcinoma hepatocelular (62%). Essa diferença entre nosso estudo e a literatura sobre a positividade da Napsin A nos carcinomas não pulmonares demonstra a necessidade de que marcadores imuno-histoquímicos sítio-específicos novos sejam estudados com amostras amplas e diversificadas para que sua especificidade possa ser validada.

Uma possível aplicação de Napsin A é para determinação primária de um tumor escamoso. Essa é uma determinação particularmente difícil, pois carcinomas escamosos de qualquer sítio primário são muito parecidos histologicamente, e embora haja bons marcadores para confirmar diferenciação escamosa de um tumor indiferenciado (como p63, por exemplo), os marcadores sítio-específicos não foram úteis para localização de sítio primário de escamoso. Napsin A é uma exceção, pois foi positivo em 26% dos carcinomas escamosos de pulmão, e teve positividade menor nos carcinomas escamosos de outros sítios. Portanto, por exemplo, num paciente com história de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço e presença de carcinoma escamoso no pulmão (quadro não raro em fumantes), a positividade para Napsin A no carcinoma presente no pulmão favorece um novo primário em vez de metástase.

Os marcadores gastrointestinais, CDX-2 e villin, tiveram alta percentagem de positividade para cólon-retos, 95% (CDX-2) e 94% (villin). Quanto aos outros sítios, também foram bons marcadores para adenocarcinoma de estômago (36% para CDX-2 e 64% para villin), e adenocarcinoma de esôfago e de junção esôfago-gástrica (52% para CDX-2 e 76% para villin). Na literatura as percentagens de positividade para CDX-2 em adenocarcinoma de cólon são altas, de 90% a 95% ou

maior. (16, 17) Já para esôfago e estômago, as percentagens relatadas tem grande variação, de 20-30% a 70-89% (15, 19, 150, 151) Algumas dessas diferenças podem ser devido a diferente limiar para positividade, pois alguns autores consideram positivo somente expressão intensa e difusa. (151)

Quanto a órgãos além do tubo digestivo, encontramos similarmente à literatura expressão de CDX-2 em carcinoma de pâncreas, trato biliar, de ovário (15, 17), porém também encontramos positividade em tireóide (19%), endométrio (15%), e em menor percentagem em outros órgãos. A villin é descrita na literatura como menos específica do que CDX-2. (17) O que observamos com nossos resultados é que embora na maioria dos órgãos não-gastrointestinais o CDX-2 teve positividade menor que a villin, em alguns órgãos como tireóide, próstata e carcinoma urotelial a villin foi melhor. Então o ideal para villin e CDX-2 seria usá-los em conjunto para aumentar a especificidade.

Pax-2 foi positivo em 65% dos carcinomas renais (64% dos carcinomas de células claras, 76% dos carcinomas papilares, e em 50% dos carcinomas cromófobos). RCC foi positivo em 56% dos carcinomas renais (48% dos carcinomas de células claras, 94% dos carcinomas papilares e 10% dos carcinomas cromófobos). Quanto aos carcinomas de outros órgãos (não renais), Pax-2 foi positivo em 6% e o RCC em 7%. Outros autores tiveram resultados semelhantes: Num estudo com 95 carcinomas renais metastáticos e 183 tumores metastáticos de outros órgãos, Ozcan encontrou positividade para Pax-2 em 59/77 (77%) carcinomas renais de células claras, e 6/8 (75%) carcinomas renais do tipo papilar. (152) Nesse estudo de Ozcan, o RCC foi positivo em 38/77 (49%) dos carcinomas renais de células claras, e 6/8 (75%) carcinomas renais do tipo papilar. (152) Quanto aos tumores não-renais metastáticos, Pax-2 foi positivo em 14 de 183 casos (7%). (152) Nossos resultados assim como os da literatura sugerem que o ideal é que Pax-2 e RCC sejam usados em conjunto como marcadores sítio-específicos para carcinomas renais. Pax-2 foi negativo em todos os carcinomas de pulmão, tanto nos escamosos quanto nos não-escamosos, mostrando-se um marcador muito útil para diferenciação de sítio primário entre pulmão e rim.

Hep-Par1 foi positivo em 92% dos carcinomas hepatocelulares, e houve pequena positividade em outros órgãos, incluindo trato gastrointestinal, pulmão, colangiocarcinoma, e outros. Esses resultados foram semelhantes a literatura. (15, 35, 38, 153, 154) No diagnóstico diferencial entre carcinoma hepatocelular e

colangiocarcinoma, que é uma questão comum pela frequente localização semelhante (no caso de colangiocarcinomas intra-hepáticos), o Hep-Par1 pode ser utilizado pois favorece carcinoma hepatocelular, mas é importante notar que ele não exclui colangiocarcinoma totalmente pois foi positivo em 30% dos casos de colangiocarcinoma.

Mammaglobin foi um péssimo marcador, tendo positividade tão expressiva em tantos diversos órgãos, que demonstrou ter um valor muito limitado para determinação de sítio primário desconhecido. Pode ter algum valor como parte de um painel em casos específicos de dúvida entre dois possíveis sítios primários, por exemplo, mama e pulmão, onde a mammaglobin pode ser incluída num painel com GCDPF-15, ER, PR, TTF-1 e Napsin A. Nossos resultados foram diferentes de estudos que relataram mammaglobin como altamente específica para mama. (43, 45, 49) Essa diferença pode ser em parte explicada pela diferença de clones utilizados. Em nosso estudo utilizamos o anticorpo 304-1A5&31A5 do fabricante Zeta, enquanto que Han et al (43) utilizou um anticorpo policlonal, e Sasaki et al (45) e Takeda et al (49) utilizaram o clone 304-1A5 do fabricante Dako.

GCDPF-15 foi melhor que a mammaglobin. Nos carcinomas de mama, GCDPF-15 foi positivo em 67%; uma percentagem maior do que outros estudos que relataram positivities variando de 14% a 44,6%. (44, 155, 156) Quanto aos outros órgãos além da mama, GCDPF-15 foi um pouco mais restrito que a mammaglobin, mas ainda apresentou positividade em diversos órgãos além de mama e glândulas salivares. Uma vantagem do GCDPF-15 é que ele não foi expresso em carcinomas de ovário e endométrio (com exceção de um caso de ovário), que apresentam dificuldade diagnóstica com mama por superposição de outros marcadores como a própria mammaglobin, e ER e PR.

Quanto a estes, ER foi positivo em 89% dos carcinomas de mama, enquanto PR foi positivo em 63%. Quanto ao trato genital feminino, PR teve positividade ligeiramente superior: em carcinomas de ovário ER foi positivo em 84% e PR em 86%; e em carcinomas de endométrio ER foi positivo em 80% e PR em 97%. Porém, ER teve positividade em alguns órgãos além de mama e trato genital feminino, e PR teve positividade em vários órgãos além de mama e trato genital feminino. Essa positividade em outros órgãos é relatada na literatura, principalmente com ER. (6, 15, 79) Devido a essa positividade de ER e PR em outros órgãos, o ideal seria não usá-los isoladamente, mas incluí-los como parte de um painel.

WT1 mostrou-se um bom marcador para ovário, sendo positivo em 59% dos casos de ovário, e especialmente para os carcinomas serosos de ovário, em que foi positivo em 87% dos casos. Comparado com carcinomas de endométrio, WT1 foi positivo em 8% dos carcinomas de endométrio, mas em nenhum dos serosos de endométrio (0 positivos num total de 5 casos). Então, também de acordo com a literatura, dentre os carcinomas serosos WT1 é um bom marcador para ovário como sítio primário. (98, 99, 157, 158) Dentre os carcinomas pouco diferenciados e tumores malignos mistos Müllerianos, WT1 não foi útil para diferenciação de sítio primário, porém é necessário cautela devido ao pequeno número desses casos no nosso estudo. Já entre os endometrióides, encontramos WT1 positivo em 1/5 (20%) carcinomas endometrióides de ovário, e nenhum (0/25) dos carcinomas endometrióides de endométrio. Esses dados também foram semelhantes a literatura em que maior positividade para WT1 se encontra em carcinomas serosos, porém chamam a atenção para o fato de que raros carcinomas endometrióides de ovário também podem ser positivos para WT1. Al-Hussaini, num estudo incluindo 38 carcinomas serosos de ovário e 13 casos de carcinomas endometrióides de ovário encontrou positividade para WT1 em 36/38 (94,7%) dos carcinomas serosos de ovário e em nenhum dos carcinomas endometrióides. (98) Esse autor também estudou 25 carcinomas serosos de útero, dos quais 5 (25%) foram positivos para WT1. Ele conclui que dentre os carcinomas serosos WT1 é útil para distinguir ovário como sítio primário (caracteristicamente positividade nuclear forte e difusa) de útero como sítio primário (caracteristicamente negativo), o que foi concordante com os nossos resultados. Porém, Al-Hussaini também conclui que dentre os carcinomas pouco diferenciados de ovário, WT1 pode ser útil para determinar o tipo histológico. (98) Hwang chegou a conclusão semelhante estudando 13 carcinomas endometrióides de ovário que foram todos negativos para WT1. (157) Nisso o nosso estudo contribui para alertar que raros carcinomas endometrióides de ovário também podem ser positivos para WT1.

Quanto a carcinomas além do trato ginecológico feminino, em nosso estudo WT1 teve baixa positividade, (13% em glândula salivar, 10% em mama, 1% em carcinomas não escamosos de pulmão, e 3% em próstata), de forma similar a outros relatos. (157, 159) Em uma análise de 153 casos de carcinoma de mama, Domfeh concluiu que os carcinomas de mama que expressam WT1 eram mucinosos ou pelo menos tinham um componente mucinoso associado. (159) Nossos resultados

incluiram 8 carcinomas de mama positivo para WT1 sendo que 7 eram ductais e somente 1 era mucinoso, porém uma limitação do nosso estudo é que o tipo histológico foi dado pelo laudo e confirmado pela estudo de uma ou mais lâminas, ou seja não analisamos todas as lâminas de cada caso. Portanto é possível que um componente mucinoso possa ter passado despercebido.

Os resultados de CK7 e CK20 sugerem cautela no uso da simplificação para divisão de sítios primários baseado nas quatro opções de positividade. Nossos resultados foram condizentes com essa classificação da literatura em carcinomas de vários órgãos: mama, adenocarcinoma de pulmão, tireóide, adenocarcinoma de endométrio, adenocarcinoma de endocérvice, carcinomas de ovário (serosos, mucinosos e endometrióides), carcinomas de estômago, pâncreas, glândula salivar, carcinomas uroteliais e colangiocarcinomas. (15-17)

Adenocarcinoma cólon-retal é classificado no grupo negativo para CK7 e positivo para CK20. (15-17) Porém se analisarmos separados os resultados de cólon e reto, há uma diferença. Carcinoma de cólon se enquadra bem no grupo, pois a positividade para CK7 foi 0%, e para CK20 foi 94%. Já o adenocarcinoma de reto foi positivo em 30% dos casos para CK7 e 93% para CK20; ou seja embora a maioria dos casos desse adenocarcinoma se enquadra no grupo negativo para CK7 e positivo para CK20, quase um terço se enquadra no grupo positivo para as duas. Essa possível positividade de adenocarcinoma de reto já havia sido descrita em um estudo de 2003. (160)

Carcinoma de células renais papilares, embora não descrito na classificação dos quatro grupos, foi positivo para CK7 no nosso estudo em 13/16 casos (81%), estando de acordo com a literatura. (69)

Carcinomas classificados na literatura como negativos para as duas citoqueratinas tiveram positividade para CK7 em pequena percentagem: carcinomas escamosos (13% a 38%), carcinoma de próstata (18%), carcinoma de células renais tipo células claras (28%), e carcinoma hepatocelular (23%).

Então o mais recomendável seria usar as citoqueratinas 7 e 20 em conjunto com marcadores sítio-específicos e, em cada caso particular, consultar a tabela de positivities de CK7 e CK20 em vez de rotular cada órgão como esperado positivo ou negativo.

A positividade de p16 em carcinoma escamoso é descrita principalmente para diferenciar displasia/neoplasia da cérvix uterina de lesões benignas (120, 158), e como fator prognóstico em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço. (123, 161)

Na nossa avaliação para determinação de sítio primário de carcinomas metastáticos, p16 tem utilidade no diferencial de carcinomas escamosos, sendo que sua positividade afasta pulmão e favorece outros sítios (anogenital, cabeça e pescoço, pele ou esôfago). (162) Todos os 30 carcinomas escamosos de pulmão avaliados em nosso estudo foram negativos para p16. Há relatos, entretanto, de positividade de p16 em carcinoma escamoso de pulmão por outros autores: Zhang avaliou 30 carcinomas escamosos de pulmão e comparou com 30 carcinomas de células de pequena de pulmão, e encontrou positividade para p16 em 100% dos casos de carcinoma de células pequenas e em 53% dos casos de carcinomas escamosos de pulmão. (163) Esses resultados foram bem diferentes dos nossos, tanto nos carcinomas escamosos quanto nos carcinomas de células pequenas, onde só encontramos positividade para p16 em 2 casos num total de 17. É importante observar que usamos o clone p16INK4a do fabricante MTM, enquanto Zhang usou um clone diferente: clone G175-405 do fabricante B-D Pharmingen, o que pode explicar a diferença de resultados. (163)

Quanto aos adenocarcinomas, p16 é descrito na literatura como útil na dúvida entre origem endocervical ou endometrial de um adenocarcinoma, pois a maioria dos adenocarcinomas endocervicais exibe positividade difusa, enquanto os adenocarcinomas endometriais do tipo endometrióide são negativos ou exibem positividade focal. (120) Similarmente, na dúvida entre primário da endocérvice e ovário, a positividade para p16 favorece endocérvice. (120) Em nosso estudo, embora a positividade de p16 tenha sido 100% em endocérvice e menor nos outros dois órgãos (endométrio 53% e ovário 64%), não podemos concluir sobre a utilidade de p16 nessa diferenciação pois a nossa amostra de adenocarcinomas da endocérvice foi muito pequena.

Em outros órgãos além do trato ginecológico, p16 teve positividade intermediária em vários órgãos, não tendo valor no diagnóstico diferencial de adenocarcinoma.

Quanto ao carcinoma urotelial, uroplakin III foi positivo em 87% dos casos, uma percentagem um pouco maior que a da literatura, que refere em torno de 60%. (89-92) Quanto a carcinomas de outros órgãos, nosso estudo contribuiu com a

observação de que uroplakin III não é tão específica para carcinomas uroteliais como outros relatos propuseram. Parker relatou uroplakin III negativo em todos os 255 tumores não-uroteliais estudados num microarray de tecido (34 carcinomas de ovário, 31 carcinomas de mama, 48 adenocarcinomas de cólon, 37 carcinomas de pulmão de não-células pequenas, 38 carcinomas de próstata, 14 melanomas, 18 glioblastomas multiformes, e 35 linfomas). (91) Em um estudo de carcinomas uroteliais de alto grau e carcinomas prostáticos, Mhaweck relatou que nenhum dos 40 carcinomas de próstata estudados foi positivo para uroplakin III. (92) Kaufmann relatou uroplakin III negativo em 318 carcinomas não uroteliais estudados, incluindo 39 carcinomas de mama, 21 carcinomas de cólon, 25 carcinomas de ovário, 13 carcinomas de pâncreas, 27 carcinomas de estômago, 16 carcinomas de trato biliar, 7 carcinomas hepatocelulares, 32 carcinomas de células renais, 2 carcinomas de úraco, 36 carcinomas escamosos, 53 carcinomas de pulmão, 3 carcinomas de supra-renal, 15 carcinomas de próstata, 8 carcinomas de endométrio, 7 carcinomas de tireóide, 8 carcinomas anais, e 6 carcinomas embrionários. (89)

Porém, em nosso estudo uroplakin III foi positivo em 99 de 747 casos de carcinomas não-uroteliais (13%). As maiores percentagens foram 10/12 (83%) casos de carcinomas hepatocelulares, 8/9 (89%) casos de colangiocarcinomas. Porém, carcinomas de vários outros órgãos tiveram positividade em menor percentagem, incluindo tireóide (16/50 casos, 32%), pâncreas (10/44 casos, 23%), cólon-reto (18/69 casos, 26%), glândulas salivares (5/15 casos, 33%), mama (6/81 casos, 7%), endométrio (9/39 casos, 23%), ovário (9/44 casos, 20%), e endocérvice (2/3 casos, 67%). Essa diferença entre nosso estudo e a literatura sobre a positividade de uroplakin III nos carcinomas não-uroteliais é outro exemplo da necessidade de extensos estudos para validação de marcadores imuno-histoquímicos sítio-específicos.

CK5/6 foi positivo em 60% dos carcinomas uroteliais, e quase 100% dos carcinomas escamosos. Porém foi negativo em todos os carcinomas hepatocelulares e positivo em 30% dos colangiocarcinomas, demonstrando que é um bom marcador para ser usado em conjunto com uroplakin III. Numa análise de 509 carcinomas que incluiu 24 carcinomas uroteliais e 25 carcinomas escamosos de pele, Chu encontrou positividade para CK5/6 em 62% dos carcinomas uroteliais e em 100% dos escamosos, semelhantes aos nossos resultados. (29) No estudo de Chu não foram incluídos carcinomas escamosos de outros sítios além de pele. Um outro estudo que

inclui 15 carcinomas escamosos de pulmão em líquidos serosos também revelou 100% de positividade para CK5/6. (164) Já outro autor, Kaufmann, relatou percentagens menores, num estudo comparando p63 e CK5/6, de 20 carcinomas uroteliais CK5/6 foi positivo em somente 7 (35%) enquanto que p63 foi positivo em 14 (70%), por isso ele sugere a inclusão de p63 também como marcador urotelial em conjunto com CK5/6 e uroplakin III. (26) Em carcinomas escamosos poucos diferenciados de diferentes sítios, a positividade no estudo de Kauffman foi de 84% para CK5/6 e 81% para p63. (26) Nossa maior percentagem de positividade pode ser devida a diferença na diferenciação, já que o nosso estudo incluiu carcinomas de diferentes graus de diferenciação e não somente pouco diferenciados.

Nossos resultados mostram que há marcadores imuno-histoquímicos muito bons para provar que um carcinoma é escamoso, como K903, CK5/6, e p63, sendo que o melhor de todos é p63. Porém, imuno-histoquímica não é muito útil para identificar o sítio de origem de um carcinoma escamoso metastático. Carcinomas escamosos são em sua maioria negativos para CK7, e são quase todos negativos para CK20. Villin e CDX-2 não têm valor nenhum para determinar sítio primário de um carcinoma escamoso. TTF-1, embora seja um bom marcador sítio específico para pulmão, é muito infreqüentemente positivo quando o tipo histológico é escamoso. Um artigo de revisão sobre imuno-histoquímica de carcinomas primários e metastáticos do/para o pulmão relatou 7% a 10% de positividade de carcinoma escamoso do pulmão para TTF-1. (58) No nosso estudo, a positividade foi menos freqüente, 3% (1 caso positivo num total de 31 casos). Porém a positividade de TTF-1 em carcinoma escamoso pulmonar varia na literatura de 0 a 37,5%. (162) Entretanto, como TTF-1 foi negativo em carcinomas escamosos de todos os outros sítios, ainda é recomendado que seja usado, pois sua positividade, embora rara, favorece pulmão como sítio primário. Positividade para Napsin A também favorece pulmão, mas deve ser interpretada com cautela, pois também pode ser positivo em outros sítios em menor percentagem. p16 também é recomendado com o objetivo inverso: positividade favorece qualquer outro sítio que não pulmão, já que foi negativo em todos os carcinomas escamosos de pulmão; e foi positivo em carcinomas escamosos de outros órgãos com positividade variando de 24% a 45%.

Este estudo apresentou várias limitações. Primeiramente limitações da própria técnica de microarray, que apesar de excelente para facilitar a pesquisa de grande número de amostras e para minimizar o custo devido à importante redução da

quantidade de anticorpo necessário, tem a desvantagem da perda de algumas amostras. Alguns círculos de tecido se descolam da lâmina no processamento. Alguns círculos continham apenas estroma ou tecidos benignos. Além disso, a pequena área de tecido disponível faz com que rugas ou dobras possam comprometer todo o tecido utilizado. Para evitar essa perda de amostras, uma solução seria incluir os tecidos doadores em duplicata ou triplicata, o que não foi feito por limitação de tempo e recursos.

Houve limitações na amostra, como a ausência de alguns tipos de carcinoma que não foram encontrados nos arquivos eletrônicos no período pesquisado, por exemplo carcinoma de supra-renal, carcinoma de timo. Também houve ausência de tipos histológicos de alguns órgãos, como carcinoma insular de tireóide, carcinoma de tireóide tipo Hurthle, adenocarcinoma de bexiga, carcinoma de rim do ducto coletor, etc. Ainda alguns tipos de carcinoma tiveram um número muito pequeno de amostras, como adenocarcinoma de endocérvice, carcinomas de glândula salivar (destes a amostra pequena impediu a análise por tipo histológico). E outros tipos de carcinoma tiveram uma amostra que embora não tão pequena, idealmente deveria ser maior, por exemplo carcinomas hepatocelulares, colangiocarcinomas, etc.

Nos critérios de inclusão e exclusão, uma limitação foi a ausência de avaliação dos prontuários dos pacientes, e de seguimento clínico, para confirmar se realmente os carcinomas que estudamos foram primários. É possível que alguns tenham sido metástases de outros órgãos, especialmente os carcinomas em órgãos que são sítio comum de metástase, como pulmão e fígado.

Outro ponto de limitação é que o trabalho analisou somente carcinomas primários, com a intenção de elaborar um painel para ser utilizado na avaliação de carcinomas metastáticos. Embora a expressão imuno-histoquímica seja geralmente mantida nas metástases, em alguns casos ela pode ser diferente. (73) Um futuro estudo com comparação desses marcadores sítio-específicos em sítios primários e suas metástases seria importante para confirmação de sua utilidade.

A análise também apresentou limitações. Ela não foi subdividida dentro de cada tipo de carcinoma por diferenciação, e sabe-se que carcinomas pouco diferenciados podem ter expressão imuno-histoquímica diferente de carcinomas bem diferenciados. (145) Outra limitação foi a ausência de avaliação semiquantitativa, por percentagens de células positivas ou por intensidade. Por exemplo, num estudo de carcinomas de próstata, Goldstein classificou os casos como negativo (0%), ou

positivo em diferentes categorias de acordo com a percentagem de células positivas: <5%, 5-25%, 26-50%, 51-75%, >75%. (145) Outros autores fizeram análise semiquantitativa tanto pela percentagem de células positivas quanto pela intensidade da expressão (de 0 a 3+) (165, 166). No nosso estudo só avaliamos a expressão como positiva ou negativa, e pode ser que a diferença de intensidade ou de percentagem de células positivas tenha importância em alguns órgãos.

Embora um número grande de marcadores (24) tenha sido usado, ainda há outros marcadores na literatura também considerados de certa forma sítio-específicos, por exemplo MUC-1, MUC-2, MUC-5AC, claudin 4, etc. (167-169) Os 24 marcadores usados neste estudo foram escolhidos após extensa revisão bibliográfica, e os marcadores não selecionados foram excluídos porque os estudos disponíveis não demonstraram especificidade suficiente. Mas idealmente o estudo poderia ser ampliado, incluindo por exemplo 30 marcadores ou mais, ainda que para confirmar que alguns marcadores não são contributórios.

Outra limitação não tanto da metodologia, mas do estado da arte em marcadores sítio-específicos é que não existem marcadores sítio-específicos para alguns órgãos, por exemplo pâncreas. À medida que novos marcadores sejam desenvolvidos e disponibilizados, novos estudos serão necessários para que o painel de marcadores sítio-específicos seja revisto e ampliado.

Similarmente, embora alguns marcadores tenham excelente especificidade para certos órgãos (como tireoglobulina para tireóide e PSA para próstata), a maioria dos marcadores apresenta positividade intermediárias para vários órgãos. Por exemplo, na dúvida entre um carcinoma hepatocelular e um colangiocarcinoma, o marcador Hep-Par1 deve ser utilizado, já que é positivo em 92% dos carcinomas hepatocelulares. Porém, ele também é positivo em 30% dos colangiocarcinomas. Então fica a dúvida de como interpretar esses 30% de positividade num caso individual. O que temos feito na prática clínica e recomendamos é usar as melhores opções dentre os marcadores disponíveis, e em casos com positividade intermediárias, colocar comentários no laudo após o diagnóstico. No exemplo de dúvida entre carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma, um exemplo de comentário seria "Positividade para Hep-Par1 favorece carcinoma hepatocelular, mas não exclui colangiocarcinoma completamente pois uma pequena parte dos colangiocarcinomas pode ser positiva para Hep-Par1". Além de comentários no

laudo, é recomendável sempre que possível discutir o caso com o médico responsável pelo tratamento do paciente.

8 CONCLUSÕES

8.1. RECOMENDAÇÕES PARA CARCINOMAS METASTÁTICOS DE SÍTIO PRIMÁRIO DESCONHECIDO:

8.1.1 De Diferenciação Escamosa

A maioria dos marcadores imuno-histoquímicos tem valor muito limitado para determinar o sítio primário de um carcinoma escamoso. O que pode ter alguma utilidade é um painel com TTF-1, Napsin A e p16. Positividade para TTF-1 e/ou Napsin A favorece pulmão, enquanto positividade para p16 favorece outros sítios como cabeça e pescoço, esôfago ou anogenital. (162)

8.1.2 Carcinomas não-escamosos

O seguinte painel é recomendado: TTF-1, CDX-2, Villin, Pax-2, RCC, Uroplakin III, CK5/6, Hep-Par1, Tireoglobulina, CK7, CK20. Para pacientes do sexo masculino, acrescentar PSA. Para pacientes do sexo feminino, acrescentar ER, PR WT-1, e GCDFP-15

8.1.3 Pouco Diferenciado / Indiferenciado

É primeiramente recomendável confirmar se trata-se de carcinoma com positividade para AE1/AE3 e Cam5.2; e incluir marcadores para outros tumores malignos como CD45 para linfoma, S-100 para melanoma, vimentina para sarcoma, etc.

Então é recomendado p63 para procurar diferenciação escamosa. Então acrescentar os outros marcadores de adenocarcinoma acima referidos.

8.2. RECOMENDAÇÕES PARA DISTINÇÃO ENTRE DOIS POSSÍVEIS SÍTIOS PRIMÁRIOS DIFERENTES

Diferente do caso de metástase de sítio primário desconhecido, o painel de marcadores deve ser individualizado para cada caso.

Então, para diminuir o custo, o recomendado é seguir o painel de anticorpos do item 1 (para carcinoma escamoso, carcinoma não-escamoso, ou carcinoma pouco diferenciado / indiferenciado), porém observar na tabela 26 os dois órgãos em questão, e excluir do painel os anticorpos que não apresentem diferença expressiva de positividade entre esses dois órgãos.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
2. Câncer no Brasil: Presente e Futuro. Rev Assoc Med Bras. 2004;50:1.
3. Elsheikh T, Silverman JF. Differential diagnosis of metastatic tumors. In: Silverberg S, DeLellis RA, Frable W, Livolsi VA, Wick MR, editores. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology. 4th ed: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 167-90.
4. Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. Eur J Cancer. 2003;39:1990-2005.
5. Varadhachary GR, Raber MN, Matamoros A, Abbruzzese JL. Carcinoma of unknown primary with a colon-cancer profile-changing paradigm and emerging definitions. The Lancet Oncology. 2008;9:596-9.
6. Kaufmann O, Köther S, Dietel M. Use of antibodies against estrogen and progesterone receptors to identify metastatic breast and ovarian carcinomas by conventional immunohistochemical and tyramide signal amplification methods. Mod Pathol. 1998;11:357-63.
7. Ravn V, Havsteen H, Thorpe SM. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded, formalin-fixed endometrial tissues: comparison with enzyme immunoassay and immunohistochemical analysis of frozen tissue. Mod Pathol. 1998;11:709-15.
8. Nash JW, Morrison C, Frankel WL. The utility of estrogen receptor and progesterone receptor immunohistochemistry in the distinction of metastatic breast carcinoma from other tumors in the liver. Arch Pathol Lab Med. 2003;127:1591-5.
9. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. Am J Clin Pathol. 2005;123:21-7.
10. Yeh IT, Mies C. Application of immunohistochemistry to breast lesions. Arch Pathol Lab Med. 2008;132:349-58.

11. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71-96.
12. DeYoung BR, Wick MR. Immunohistologic evaluation of metastatic carcinomas of unknown origin: an algorithmic approach. *Semin Diagn Pathol.* 2000;17:184-93.
13. Dennis JL, Hvidsten TR, Wit EC et al. Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3766-72.
14. Park SY, Kim BH, Kim JH, Lee S, Kang GH. Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:1561-7.
15. Bahrami A, Truong LD, Ro JY. Undifferentiated tumor: true identity by immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:326-48.
16. Krishna M. Diagnosis of metastatic neoplasms: an immunohistochemical approach. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:207-15.
17. Oien KA. Pathologic evaluation of unknown primary cancer. *Semin Oncol.* 2009;36:8-37.
18. Barbareschi M, Murer B, Colby TV et al. CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:141-9.
19. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:303-10.
20. McCluggage WG, Shah R, Connolly LE, McBride HA. Intestinal-type cervical adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma exhibit a partial enteric immunophenotype with consistent expression of CDX2. *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27:92-100.
21. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. *Am J Pathol.* 1984;114:309-21.
22. Gown AM, Vogel AM. Anti-intermediate filament monoclonal antibodies: tissue-specific tools in tumor diagnosis. *Surv Synth Pathol Res.* 1984;3:369-85.

23. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. III. Analysis of tumors. *Am J Clin Pathol.* 1985;84:413-24.
24. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982;31:11-24.
25. Clover J, Oates J, Edwards C. Anti-cytokeratin 5/6: a positive marker for epithelioid mesothelioma. *Histopathology.* 1997;31:140-3.
26. Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2001;116:823-30.
27. Ordonez NG. Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:1215-21.
28. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gartner F, Schmitt FC. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.* 2003;443:122-32.
29. Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol.* 2002;15:6-10.
30. Wick MR, Lillemoe TJ, Copland GT, Swanson PE, Manivel JC, Kiang DT. Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer: immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin. *Hum Pathol.* 1989;20:281-7.
31. Fiel MI, Cernaianu G, Burstein DE, Batheja N. Value of GCDFP-15 (BRST-2) as a specific immunocytochemical marker for breast carcinoma in cytologic specimens. *Acta Cytol.* 1996;40:637-41.
32. Mazoujian G, Margolis R. Immunohistochemistry of gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) in 65 benign sweat gland tumors of the skin. *Am J Dermatopathol.* 1988;10:28-35.
33. Mazoujian G, Pinkus GS, Davis S, Haagensen DE, Jr. Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am J Pathol.* 1983;110:105-12.

34. Swanson PE, Pettinato G, Lillemoe TJ, Wick MR. Gross cystic disease fluid protein-15 in salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 1991;115:158-63.
35. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2002;33:1175-81.
36. Morrison C, Marsh W, Jr., Frankel WL. A comparison of CD10 to pCEA, MOC-31, and hepatocyte for the distinction of malignant tumors in the liver. *Mod Pathol.* 2002;15:1279-87.
37. Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol.* 1993;143:1050-4.
38. Chu PG, Ishizawa S, Wu E, Weiss LM. Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:978-88.
39. Kakar S, Muir T, Murphy LM, Lloyd RV, Burgart LJ. Immunoreactivity of Hep Par 1 in hepatic and extrahepatic tumors and its correlation with albumin in situ hybridization in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2003;119:361-6.
40. Fan Z, van de Rijn M, Montgomery K, Rouse RV. Hep par 1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: 676 tumors tested using tissue microarrays and conventional tissue sections. *Mod Pathol.* 2003;16:137-44.
41. Pitman MB, Triratanachat S, Young RH, Oliva E. Hepatocyte paraffin 1 antibody does not distinguish primary ovarian tumors with hepatoid differentiation from metastatic hepatocellular carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23:58-64.
42. Maitra A, Murakata LA, Albores-Saavedra J. Immunoreactivity for hepatocyte paraffin 1 antibody in hepatoid adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:689-94.
43. Han J-H, Kang Y, Shin H-C et al. Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:1330-4.
44. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol.* 2007;127:103-13.

45. Sasaki E, Tsunoda N, Hatanaka Y, Mori N, Iwata H, Yatabe Y. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Mod Pathol*. 2007;20:208-14.
46. Fritzsche FR, Thomas A, Winzer KJ et al. Co-expression and prognostic value of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin in primary breast cancer. *Histology And Histopathology*. 2007;22:1221-30.
47. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H et al. Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *J Pathol*. 1999;189:28-33.
48. Onuma K, Dabbs DJ, Bhargava R. Mammaglobin expression in the female genital tract: immunohistochemical analysis in benign and neoplastic endocervix and endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27:418-25.
49. Takeda Y, Tsuta K, Shibuki Y et al. Analysis of expression patterns of breast cancer-specific markers (mammaglobin and gross cystic disease fluid protein 15) in lung and pleural tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:239-43.
50. Tassi RA, Bignotti E, Rossi E et al. Overexpression of mammaglobin B in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecologic Oncology*. 2007;105:578-85.
51. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Research*. 1999;59:3028-31.
52. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:249-57.
53. Chuman Y, Bergman A, Ueno T et al. Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS Letters*. 1999;462:129-34.
54. Dejmek A, Naucner P, Smedjeback A et al. Napsin A (TA02) is a useful alternative to thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for the identification of pulmonary adenocarcinoma cells in pleural effusions. *Diagn Cytopathol*. 2007;35:493-7.
55. Bishop JA, Sharma R, Illei PB. Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Hum Pathol*. 2010;41:20-5.
56. Suzuki A, Shijubo N, Yamada G et al. Napsin A is useful to distinguish primary lung adenocarcinoma from adenocarcinomas of other organs. *Pathol Res Pract*. 2005;201:579-86.

57. Ueno T, Linder S, Elmberger G. Aspartic proteinase napsin is a useful marker for diagnosis of primary lung adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2003;88:1229-33.
58. Jagirdar J. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of primary and metastatic carcinoma to the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:384-96.
59. Hirano T, Auer G, Maeda M et al. Human tissue distribution of TA02, which is homologous with a new type of aspartic proteinase, napsin A. *Jpn J Cancer Res*. 2000;91:1015-21.
60. Lowe FC, Trauzzi SJ. Prostatic acid phosphatase in 1993. Its limited clinical utility. *Urol Clin North Am*. 1993;20:589-95.
61. Alanen KA, Kuopio T, Koskinen PJ, Nevalainen TJ. Immunohistochemical labelling for prostate specific antigen in non-prostatic tissues. *Pathol Res Pract*. 1996;192:233-7.
62. Kuriyama M, Wang MC, Lee CL et al. Multiple marker evaluation in human prostate cancer with the use of tissue-specific antigens. *J Natl Cancer Inst*. 1982;68:99-105.
63. Nadji M, Tabei SZ, Castro A, Chu TM, Morales AR. Prostatic origin of tumors. An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol*. 1980;73:735-9.
64. Kramer SA, Farnham R, Glenn JF, Paulson DF. Comparative morphology of primary and secondary deposits of prostatic adenocarcinoma. *Cancer*. 1981;48:271-3.
65. Bodey B, Bodey B, Jr., Kaiser HE. Immunocytochemical detection of prostate specific antigen expression in human primary and metastatic melanomas. *Anticancer Res*. 1997;17:2343-6.
66. Daniel L, Lechevallier E, Giorgi R et al. Pax-2 expression in adult renal tumors. *Hum Pathol*. 2001;32:282-7.
67. Gokden N, Gokden M, Phan DC, McKenney JK. The utility of PAX-2 in distinguishing metastatic clear cell renal cell carcinoma from its morphologic mimics: an immunohistochemical study with comparison to renal cell carcinoma marker. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1462-7.
68. Gokden N, Kemp SA, Gokden M. The utility of Pax-2 as an immunohistochemical marker for renal cell carcinoma in cytopathology. *Diagn Cytopathol*. 2008;36:473-7.

69. Mazal PR, Stichenwirth M, Koller A, Blach S, Haitel A, Susani M. Expression of aquaporins and PAX-2 compared to CD10 and cytokeratin 7 in renal neoplasms: a tissue microarray study. *Mod Pathol*. 2005;18:535-40.
70. Memeo L, Jhang J, Assaad AM et al. Immunohistochemical analysis for cytokeratin 7, KIT, and PAX2: value in the differential diagnosis of chromophobe cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:225-9.
71. Tong GX, Chiriboga L, Hamele-Bena D, Borczuk AC. Expression of PAX2 in papillary serous carcinoma of the ovary: immunohistochemical evidence of fallopian tube or secondary Mullerian system origin? *Mod Pathol*. 2007;20:856-63.
72. Wasco MJ, Pu RT. Comparison of PAX-2, RCC antigen, and antiphosphorylated H2AX antibody (gamma-H2AX) in diagnosing metastatic renal cell carcinoma by fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol*. 2008;36:568-73.
73. McGregor DK, Khurana KK, Cao C et al. Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: the use of the monoclonal antibody 'Renal Cell Carcinoma Marker'. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:1485-92.
74. Bakshi N, Kunju LP, Giordano T, Shah RB. Expression of renal cell carcinoma antigen (RCC) in renal epithelial and nonrenal tumors: diagnostic Implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15:310-5.
75. Fujiwara H, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Koulos JP, Wright TC, Jr. Adenocarcinoma of the cervix. Expression and clinical significance of estrogen and progesterone receptors. *Cancer*. 1997;79:505-12.
76. Halperin R, Zehavi S, Hadas E, Habler L, Bukovsky I, Schneider D. Immunohistochemical comparison of primary peritoneal and primary ovarian serous papillary carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2001;20:341-5.
77. Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol*. 2000;13:379-88.
78. Lee BH, Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS. WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:745-50.
79. Dabbs DJ, Landreneau RJ, Liu Y et al. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2002;73:403-6.

80. Gong Y, Joseph T, Sneige N. Validation of commonly used immunostains on cell-transferred cytologic specimens. *Cancer*. 2005;105:158-64.
81. McCluggage WG, Young RH. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the evaluation of ovarian tumors. *Semin Diagn Pathol*. 2005;22:3-32.
82. Bejarano PA, Nikiforov YE, Swenson ES, Biddinger PW. Thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in thyroid neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000;8:189-94.
83. Burt A, Goudie RB. Diagnosis of primary thyroid carcinoma by immunohistological demonstration of thyroglobulin. *Histopathology*. 1979;3:279-86.
84. Katoh R, Kawaoi A, Miyagi E et al. Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2000;13:570-6.
85. Shvero J, Koren R, Shpitzer T, Feinmesser R, Segal K. Immunohistochemical profile and treatment of uncommon types of thyroid carcinomas. *Oncology Reports*. 2003;10:2075-8.
86. Lau SK, Luthringer DJ, Eisen RN. Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10:97-102.
87. Nakamura N, Miyagi E, Murata S, Kawaoi A, Katoh R. Expression of thyroid transcription factor-1 in normal and neoplastic lung tissues. *Mod Pathol*. 2002;15:1058-67.
88. Rossi G, Marchioni A, Milani M et al. TTF-1, cytokeratin 7, 34betaE12, and CD56/NCAM immunostaining in the subclassification of large cell carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:884-93.
89. Kaufmann O, Volmerig J, Dietel M. Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:683-7.
90. Lobban ED, Smith BA, Hall GD et al. Uroplakin gene expression by normal and neoplastic human urothelium. *Am J Pathol*. 1998;153:1957-67.
91. Parker DC, Folpe AL, Bell J et al. Potential utility of uroplakin III, thrombomodulin, high molecular weight cytokeratin, and cytokeratin 20 in noninvasive, invasive, and metastatic urothelial (transitional cell) carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1-10.

92. Mhaweche P, Uchida T, Pelte M-Fo. Immunohistochemical profile of high-grade urothelial bladder carcinoma and prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2002;33:1136-40.
93. Sharma S, Tan J, Sidhu G, Wieczorek R, Miller DC, Cassai ND. Lung adenocarcinomas metastatic to the brain with and without ultrastructural evidence of rootlets: an electron microscopic and immunohistochemical study using cytokeratins 7 and 20 and villin. *Ultrastructural Pathology.* 1998;22:385-91.
94. Tan J, Sidhu G, Greco MA, Ballard H, Wieczorek R. Villin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 expression in pulmonary adenocarcinoma with ultrastructural evidence of microvilli with rootlets. *Hum Pathol.* 1998;29:390-6.
95. Bacchi CE, Gown AM. Distribution and pattern of expression of villin, a gastrointestinal-associated cytoskeletal protein, in human carcinomas: a study employing paraffin-embedded tissue. *Lab Invest.* 1991;64:418-24.
96. Nambu Y, Iannettoni MD, Orringer MB, Beer DG. Unique expression patterns and alterations in the intestinal protein villin in primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas. *Mol Carcinog.* 1998;23:234-42.
97. Shimizu M, Toki T, Takagi Y, Konishi I, Fujii S. Immunohistochemical detection of the Wilms' tumor gene (WT1) in epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol.* 2000;19:158-63.
98. Al-Hussaini M, Stockman A, Foster H, McCluggage WG. WT-1 assists in distinguishing ovarian from uterine serous carcinoma and in distinguishing between serous and endometrioid ovarian carcinoma. *Histopathology.* 2004;44:109-15.
99. Hashi A, Yuminamochi T, Murata S-I, Iwamoto H, Honda T, Hoshi K. Wilms tumor gene immunoreactivity in primary serous carcinomas of the fallopian tube, ovary, endometrium, and peritoneum. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22:374-7.
100. Acs G, Pasha T, Zhang PJ. WT1 is differentially expressed in serous, endometrioid, clear cell, and mucinous carcinomas of the peritoneum, fallopian tube, ovary, and endometrium. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23:110-8.
101. Dupont J, Wang X, Marshall DS et al. Wilms Tumor Gene (WT1) and p53 expression in endometrial carcinomas: a study of 130 cases using a tissue microarray. *Gynecologic Oncology.* 2004;94:449-55.

102. Egan JA, Ionescu MC, Eapen E, Jones JG, Marshall DS. Differential expression of WT1 and p53 in serous and endometrioid carcinomas of the endometrium. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23:119-22.
103. Goldstein NS, Uzieblo A. WT1 immunoreactivity in uterine papillary serous carcinomas is different from ovarian serous carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:541-5.
104. Waldstrom M, Grove A. Immunohistochemical expression of wilms tumor gene protein in different histologic subtypes of ovarian carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129:85-8.
105. Ramaekers F, Huysmans A, Schaart G, Moesker O, Vooijs P. Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp Cell Res.* 1987;170:235-49.
106. van Niekerk CC, Jap PH, Ramaekers FC, van de Molengraft F, Poels LG. Immunohistochemical demonstration of keratin 7 in routinely fixed paraffin-embedded human tissues. *J Pathol.* 1991;165:145-52.
107. Loy TS, Calaluce RD. Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1994;102:764-7.
108. van de Molengraft FJ, van Niekerk CC, Jap PH, Poels LG. OV-TL 12/30 (keratin 7 antibody) is a marker of glandular differentiation in lung cancer. *Histopathology.* 1993;22:35-8.
109. Ramaekers F, van Niekerk C, Poels L et al. Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *Am J Pathol.* 1990;136:641-55.
110. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1992;140:427-47.
111. Goldstein NS, Thomas M. Mucinous and nonmucinous bronchioloalveolar adenocarcinomas have distinct staining patterns with thyroid transcription factor and cytokeratin 20 antibodies. *Am J Clin Pathol.* 2001;116:319-25.
112. Lau SK, Desrochers MJ, Luthringer DJ. Expression of thyroid transcription factor-1, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in bronchioloalveolar

carcinomas: an immunohistochemical evaluation of 67 cases. *Mod Pathol.* 2002;15:538-42.

113. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002;40:403-39.

114. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998;153:1741-8.

115. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003;16:665-73.

116. Ishikawa M, Fujii T, Masumoto N et al. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22:378-85.

117. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:884-91.

118. Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1389-99.

119. Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:187-93.

120. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2006;13:8-15.

121. Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, Cviko A, Loning T, Crum CP. Human papillomaviruses, expression of p16, and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol.* 2002;33:899-904.

122. Tringler B, Gup CJ, Singh M et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol.* 2004;35:689-96.

123. Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, Kuo LT, Huang SH, Lin MC. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. *Mod Pathol.* 2008;21:376-86.

124. Wayne S, Robinson RA. Upper aerodigestive tract squamous dysplasia: correlation with p16, p53, pRb, and Ki-67 expression. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:1309-14.
125. Armes JE, Lourie R, de Silva M et al. Abnormalities of the RB1 pathway in ovarian serous papillary carcinoma as determined by overexpression of the p16(INK4A) protein. *Int J Gynecol Pathol.* 2005;24:363-8.
126. Chuang A-Y, DeMarzo AM, Veltri RW, Sharma RB, Bieberich CJ, Epstein JI. Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:1246-55.
127. Comperat E, Camparo P, Haus R et al. Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases. *Virchows Arch.* 2006;448:319-24.
128. Thomas P, Battifora H. Keratins versus epithelial membrane antigen in tumor diagnosis: an immunohistochemical comparison of five monoclonal antibodies. *Hum Pathol.* 1987;18:728-34.
129. Listrom MB, Dalton LW. Comparison of keratin monoclonal antibodies MAK-6, AE1:AE3, and CAM-5.2. *Am J Clin Pathol.* 1987;88:297-301.
130. Leader M, Patel J, Makin C, Henry K. An analysis of the sensitivity and specificity of the cytokeratin marker CAM 5.2 for epithelial tumours. Results of a study of 203 sarcomas, 50 carcinomas and 28 malignant melanomas. *Histopathology.* 1986;10:1315-24.
131. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;455:282-306.
132. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986;55:244-8.
133. Chan JK, Wong CS, Ku WT, Kwan MY. Reflections on the use of controls in immunohistochemistry and proposal for application of a multitissue spring-roll control block. *Ann Diagn Pathol.* 2000;4:329-36.
134. Battifora H, Mehta P. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block. *Lab Invest.* 1990;63:722-4.
135. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4:844-7.

136. Torhorst J, Bucher C, Kononen J et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol.* 2001;159:2249-56.

137. Milanese-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol.* 2002;15:1366-73.

138. Avninder S, Ylaya K, Hewitt SM. Tissue microarray: A simple technology that has revolutionized research in pathology. *J Postgrad Med.* 2008;54:158-62.

139. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol.* 2003;56:198-204.

140. Nitadori J-i, Ishii G, Tsuta K et al. Immunohistochemical differential diagnosis between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma by tissue microarray analysis with a large antibody panel. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:682-92.

141. Butnor KJ, Nicholson AG, Allred DC et al. Expression of renal cell carcinoma-associated markers erythropoietin, CD10, and renal cell carcinoma marker in diffuse malignant mesothelioma and metastatic renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:823-7.

142. Kunju LP, Mehra R, Snyder M, Shah RB. Prostate-specific antigen, high-molecular-weight cytokeratin (clone 34betaE12), and/or p63: an optimal immunohistochemical panel to distinguish poorly differentiated prostate adenocarcinoma from urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:675-81.

143. Geller SA, Dhall D, Alsabeh R. Application of immunohistochemistry to liver and gastrointestinal neoplasms: liver, stomach, colon, and pancreas. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:490-9.

144. DeLellis RA, Shin SJ, Treaba DO. Immunohistology of Endocrine Tumors. In: Dabbs, David J, editor. *Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and genomic applications.* 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010. p. 298-9.

145. Goldstein NS. Immunophenotypic characterization of 225 prostate adenocarcinomas with intermediate or high Gleason scores. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:471-7.

146. Moldvay J, Jackel M, Bogos K et al. The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2004;10:85-8.

147. Srodon M, Westra WH. Immunohistochemical staining for thyroid transcription factor-1: a helpful aid in discerning primary site of tumor origin in patients with brain metastases. *Hum Pathol.* 2002;33:642-5.

148. Strickland-Marmol LB, Khoo A, Livingston SK, Rojiani A. Utility of tissue-specific transcription factors thyroid transcription factor 1 and Cdx2 in determining the primary site of metastatic adenocarcinomas to the brain. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:1686-90.

149. Hecht JL, Pinkus JL, Weinstein LJ, Pinkus GS. The value of thyroid transcription factor-1 in cytologic preparations as a marker for metastatic adenocarcinoma of lung origin. *Am J Clin Pathol.* 2001;116:483-8.

150. Kobayashi M, Ueyama Y, Nakanishi H et al. Immunocytochemical detection using CDX2: An aid for discerning tumor involvement in ascites cytology. *Cancer.* 2006;108:114-8.

151. Moskaluk CA, Zhang H, Powell SM, Cerilli LA, Hampton GM, Frierson HF, Jr. Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Mod Pathol.* 2003;16:913-9.

152. Ozcan A, Zhai Q, Javed R et al. PAX-2 is a helpful marker for diagnosing metastatic renal cell carcinoma: comparison with the renal cell carcinoma marker antigen and kidney-specific cadherin. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:1121-9.

153. Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical characterization of signet-ring cell carcinomas of the stomach, breast, and colon. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:884-92.

154. Lugli A, Tornillo L, Mirlacher M, Bundi M, Sauter G, Terracciano LM. Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2004;122:721-7.

155. Satoh F, Umemura S, Osamura RY. Immunohistochemical analysis of GCDFP-15 and GCDFP-24 in mammary and non-mammary tissue. *Breast Cancer.* 2000;7:49-55.

156. Tornos C, Soslow R, Chen S et al. Expression of WT1, CA 125, and GCDFP-15 as useful markers in the differential diagnosis of primary ovarian carcinomas versus metastatic breast cancer to the ovary. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1482-9.

157. Hwang H, Quenneville L, Yaziji H, Gown AM. Wilms tumor gene product: sensitive and contextually specific marker of serous carcinomas of ovarian surface epithelial origin. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12:122-6.
158. Mittal K, Soslow R, McCluggage WG. Application of immunohistochemistry to gynecologic pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:402-23.
159. Domfeh AB, Carley AL, Striebel JM et al. WT1 immunoreactivity in breast carcinoma: selective expression in pure and mixed mucinous subtypes. *Mod Pathol*. 2008;21:1217-23.
160. Zhang PJ, Shah M, Spiegel GW, Brooks JJ. Cytokeratin 7 immunoreactivity in rectal adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11:306-10.
161. Smith EM, Wang D, Kim Y et al. P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2008;44:133-42.
162. Pereira TC, Share SM, Magalhaes AV, Silverman JF. Can we tell the site of origin of metastatic squamous cell carcinoma? An immunohistochemical tissue microarray study of 194 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19:10-4.
163. Zhang H, Liu J, Cagle PT, Allen TC, Laga AC, Zander DS. Distinction of pulmonary small cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma: an immunohistochemical approach. *Mod Pathol*. 2005;18:111-8.
164. Pu RT, Pang Y, Michael CW. Utility of WT-1, p63, MOC31, mesothelin, and cytokeratin (K903 and CK5/6) immunostains in differentiating adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant mesothelioma in effusions. *Diagn Cytopathol*. 2008;36:20-5.
165. Du EZ, Goldstraw P, Zacharias J et al. TTF-1 expression is specific for lung primary in typical and atypical carcinoids: TTF-1-positive carcinoids are predominantly in peripheral location. *Hum Pathol*. 2004;35:825-31.
166. Saqi A, Alexis D, Remotti F, Bhagat G. Usefulness of CDX2 and TTF-1 in differentiating gastrointestinal from pulmonary carcinoids. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:394-404.
167. Chu PG, Schwarz RE, Lau SK, Yen Y, Weiss LM. Immunohistochemical staining in the diagnosis of pancreatobiliary and ampulla of Vater adenocarcinoma: application of CDX2, CK17, MUC1, and MUC2. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:359-67.

168. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 2004;122:61-9.

169. Lodi C, Szabo E, Holczbauer A et al. Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol.* 2006;19:460-9.

APÊNDICE A - TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

TRABALHO 1: “*A Tissue Microarray Immunohistochemical Study of Gynecologic Versus Breast Primary.*”

Pôster apresentado no *United States and Canadian Academy of Pathology*, em Washington, DC, Estados Unidos, em Março de 2010

RESUMO (ABSTRACT):

Background:

In the work-up of metastatic carcinoma of unknown primary, some of the immunohistochemical (IHC) markers commonly used for a gynecologic (GYN) primary such as estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) proteins are also reactive in breast primaries. Therefore, an expanded panel can be of value in indeterminate cases in the work-up of metastases of unknown primary when the differential diagnosis is a GYN versus a breast primary and/or a patient with either a known GYN or breast primary and a second primary needs to be excluded. For this differential, we evaluated a panel including ER, PR, GCDFP-15, CDX2, villin, PAX-2, mammaglobin and WT1 in a tissue *microarray* of breast carcinomas and GYN carcinomas including ovary and endometrium.

Design:

We performed immunostains in a total of 171 cases: 40 endometrium, 45 ovary, and 86 breast, including different histologic types on each. We scored as positive if at least 5% of the cells were staining, with nuclear staining for ER, PR, CDX-2, PAX-2 and WT-1; cytoplasmic staining for GCDFP-15 and mammaglobin; and membranous staining for villin. We calculated the percentage of positive cases after excluding cases in which the *microarray* dot did not contain tumor cells or was not present in that particular slide.

Results:

Percentage of positive cases

	Breast	Ovary	Endometrium
CDX-2	0%	8.2%	15.4%
Villin	0%	9.3%	10.3%
GCDFP-15	67.1%	2.3%	0%
Mammaglobin	61.3%	52.3%	69.2%
ER	89.2%	83.7%	80.0%
PR	62.5%	85.7%	97.3%
WT-1	10.1%	59.1%	7.9%
PAX-2	6.3%	18.6%	46.2%

Conclusions:

In the differential diagnosis of GYN versus breast metastatic carcinomas, the most useful markers are PAX-2 for endometrium, WT-1 for ovary, and GCDFP for breast. The markers ER, PR, and mammaglobin were not helpful due to lack of specificity. CDX-2 and villin were not very sensitive, but when positive could be helpful in excluding breast carcinoma.

TRABALHO 2: "PAX-2 and Napsin A in the Differential Diagnosis of Lung Versus Kidney Primary Site in Patients with Renal Cell Carcinoma and a New Lung Mass: A Comparison with TTF-1 and RCC Antigen"

Pôster apresentado no *United States and Canadian Academy of Pathology*, em Washington, DC, Estados Unidos, em Março de 2010

RESUMO (ABSTRACT):

Background: In the work-up of metastatic renal cell carcinoma (RCCA) versus primary lung carcinoma, some of the immunohistochemical (IHC) markers commonly used for a renal primary, such as CD 10, EMA, and vimentin, are not helpful because of lung reactivity. More useful markers include TTF-1, a lung marker, and RCC antigen, a renal marker. Since these IHC markers are not 100% sensitive nor specific, the availability of an expanded panel can be of value in indeterminate cases

in the work-up of metastases of unknown primary or when the differential diagnosis is metastasis versus lung primary. We compare two newer markers, Napsin A for lung and PAX-2 for kidney with these more established markers.

Design: Using a tissue *microarray*, we compared 88 non-small cell lung carcinomas (34 squamous, 42 adenocarcinomas, and 12 large cell carcinomas, including 4 large cell neuroendocrine carcinomas) with 52 RCCA (25 clear cell, 10 chromophobe, and 17 papillary). We interpreted the stain as positive if 5% or more of the malignant cells stained, regardless of intensity, as follows: TTF-1 and PAX-2 nuclear staining, RCC and CK 7 cytoplasmic staining, and Napsin A granular cytoplasmic staining were evaluated.

Results:

IHC Results:						
	RCC clear	RCC papillary	RCC chromophobe	Lung squamous	Lung adeno	Lung large cell
PAX-2	16/25 (64%)	13/17 (76%)	5/10 (50%)	0/31 (0%)	0/38 (0%)	0/12 (0%)
RCC antigen	12/25 (48%)	16/17 (94%)	1/10 (10%)	0/32 (0%)	2/40 (5%)	0/12 (0%)
TTF-1	0/25 (0%)	0/17 (0%)	0/10 (0%)	2/31 (6%)	36/39 (92%)	8/12 (67%)
Napsin A	11/25 (44%)	17/17 (100%)	7/10 (70%)	9/31 (29%)	37/40 (93%)	7/12 (91%)
CK7	7/25 (28%)	13/16 (81%)	6/10 (60%)	12/30 (40%)	39/39 (100%)	10/11 (91%)

Number of positive cases/Total number (Percentage of positive cases)

Note: A few cases were excluded if the corresponding "dot" of the case had no tumor present or had been lost in processing

Conclusions: For the distinction of lung non-small cell carcinoma versus RCCA in the work-up of metastases of unknown primary, or separation of metastatic RCCA in patients with a history of RCCA and a new lung mass, we found that TTF-1 is very specific for lung, and RCC and PAX-2 are very specific for kidney. CK 7 and Napsin A were not helpful in the work-up.

TRABALHO 3: “The Value of PAX-2 for the Work-Up of Metastatic Carcinoma of Unknown Primary: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study of 694 Cases”

Pôster apresentado no *United States and Canadian Academy of Pathology*, em Washington, DC, Estados Unidos, em Março de 2010

RESUMO (ABSTRACT):

Background: PAX-2 is a transcription factor that acts to regulate the expression of genes involved in mediating cell proliferation and growth, resistance to apoptosis, and cell migration. By employing tissue *microarray* technology, we evaluated the expression of Pax-2 in 694 carcinomas from various sites in order to determine its' utility in the work-up of metastatic carcinoma of unknown primary

Design: IHC was performed for Pax-2 on paraffin embedded sections from tissue *microarray* of 694 cases of carcinomas from different organs. Cases were interpreted as positive if at least 5% of tumor cells had nuclear staining.

Results: The results of positive cases per primary site are listed as percentage of positive cases % (Number of positive cases/Total number): Lung 0% (0/113), renal cell carcinoma 65.38% (34/52), GI endocrine/neuroendocrine carcinoma 0% (0/20), stomach adenocarcinoma 0% (0/14), esophageal adenocarcinoma 0% (0/20), pancreas carcinoma 4.44% (2/45), prostate carcinoma 0% (0/38), urothelial carcinoma 2.82% (2/71), hepatocellular carcinoma 0% (0/12), cholangiocarcinoma 11.11% (1/9), colorectal carcinoma 0% (0/67), salivary gland carcinoma 6.67% (1/15), breast carcinoma 6.25% (5/80), thyroid carcinoma 8.89% (4/45), endometrium carcinoma 46.15% (18/39), cervix carcinoma 0% (0/11), ovary carcinoma 8.6% (8/43)

Conclusions: Pax-2 is mostly expressed in renal cell carcinoma (65.38%) and endometrial carcinoma (46.15%), with limited to absent expression in carcinomas of other primary sites. We believe that Pax-2 is a useful marker for the work-up of metastatic carcinoma of unknown primary site, especially if renal cell or endometrial carcinoma is considered in the differential diagnosis.

TRABALHO 4: “Can We Tell the Site of Origin of Metastatic Squamous Cell Carcinoma? An Immunohistochemical Tissue Microarray Study of 194 Cases”

Pôster apresentado no *United States and Canadian Academy of Pathology*, em Washington, DC, Estados Unidos, em Março de 2010

RESUMO (ABSTRACT):

Background: In the work-up of metastatic squamous cell carcinoma (SCC), commonly used immunohistochemical (IHC) markers such as K903, p63, and CK5/6 help to confirm a squamous malignancy, but the IHC stains do not determine the primary site of origin. Moreover, unlike adenocarcinoma, IHC has not been well studied in the work-up of metastatic SCC of unknown primary. We compared the specificity of commonly used IHC markers known to support specific tissue sites, including TTF-1, CK 7, CK 20, Villin, p16, and CDX-2, to the commonly used squamous IHC markers, K903, CK 5/6, and p63

Design: Using a tissue *microarray*, we compared 194 SCC cases from the following sites as follows: 35 lung, 34 skin, 14 cervix, 4 vagina, 16 vulva, 8 penis, 9 anus, 3 rectum, 10 esophagus, 4 bladder/urethra, and 57 head and neck (4 eye/orbit, 2 parotid gland, 19 tongue, 10 tonsil, 5 oral cavity, 4 pharynx, and 13 larynx). All IHC stains were interpreted to be positive if 5% or more of the malignant cells were positive, regardless of the staining intensity

Results: p63, and K903 stained positively in 100% of cases, and CK 5/6 in nearly 100% of cases of SCC, with the exception of 2 lung SCC. TTF-1 staining was seen only in 2 of 35 lung SCC, and was negative in all other sites. Positive staining for CK 7 ranged from 12.5% in esophagus and anus to 100% in vagina. CK 20 was positive in 3.1% of lung SCC, and was negative in all other sites. CDX-2 was positive in 7.1% of vulva SCC, and was negative in all other sites. Positive staining for p16 ranged from 21.4% in vulva SCC to 75% in vagina and anus, and was negative in lung, penis, bladder/urethra, and head and neck sites other than the oral cavity. Villin was negative in all cases.

Conclusions: Although commonly used SCC markers are very sensitive and specific, they do not help identify the primary site of tumor origin. TTF-1 showed marked specificity for lung SCC, but had very low sensitivity. P16 showed high sensitivity for GYN, anal, and oral cavity primaries, but exhibited low specificity. CDX-

2 was found to be positive only in some vulvar SCC, and CK 7 was negative in SCC from the penis and oral cavity. We conclude that the primary site of SCC cannot confidently be determined by IHC alone, but certain site specific IHC markers can help in identifying the primary site in occasional cases.

TRABALHO 5: “The Value of Villin for the Work-up of Colonic Carcinoma: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study of 378 Cases.”

Pôster apresentado no Congresso Internacional da Academia Internacional de Patologia (XXVIII IAP International Congress), São Paulo, 10 a 15 de outubro de 2010

RESUMO (ABSTRACT):

Introduction: Villin, a cytoskeletal protein that is found in the microvilli of intestinal epithelium and proximal renal tubules, is an immunohistochemical marker that has been utilized in the work-up of metastatic adenocarcinoma of colon and rectum. We studied villin in 378 tumors from various sites to determine its utility in differentiating colonic AD from other primary carcinomas in the work-up of metastatic carcinoma of unknown primary.

Material and methods: IHC was performed for villin on paraffin embedded sections from a tissue *microarray* of 378 cases as follows: 40 lung adenocarcinomas, 26 gastric/esophagus/GE junction adenocarcinomas, 41 pancreatic adenocarcinomas, 39 prostatic adenocarcinomas, 46 bladder carcinomas, 36 colonic adenocarcinomas, 26 rectal adenocarcinomas, 78 breast carcinomas, 3 cervical adenocarcinomas, and 43 ovarian adenocarcinomas. Cases were interpreted as negative (no staining or blush) and positive (more than 5% of membranous staining in tumor cells).

Results: 91.7% of colon and 96.2% of rectal adenocarcinomas stained positively with villin. 73.1% of stomach/esophagus/GE, 66.7% of cervix, 31.7% of pancreas, 10% of lung, 2.2% of bladder, and 9.3% of ovary were interpreted as positive. All cases of prostate and breast carcinoma were negative.

Conclusion: Although villin is highly sensitive for primary colorectal adenocarcinoma, it is not specific, since it is positive in a significant number of other

GI primaries, such as GE and pancreas, plus is positive in primaries from other sites, such as the cervix and lung. Therefore, we believe that villin should be utilized in conjunction with other IHC markers and interpreted with caution, especially in separating a metastatic colon cancer from other GI primaries that can share a similar histologic appearance.

TRABALHO 6: “The Utility of Napsin A and Mammaglobin in the Differential Diagnosis of Metastatic Adenocarcinoma of the Breast Versus a Lung Primary.”

Pôster apresentado no Congresso Internacional da Academia Internacional de Patologia (XXVIII IAP International Congress), São Paulo, 10 a 15 de outubro de 2010

RESUMO (ABSTRACT):

Introduction: In the work-up of a case of adenocarcinoma in the lung that could be of breast or lung origin, immunohistochemical (IHC) studies including TTF-1, ER, PR, and GCDFP-15 are often utilized. We compared these to the more recent markers Napsin A (for lung) and mammaglobin (for breast).

Material and methods: We evaluated 122 cases of primary carcinoma as follows: 42 adenocarcinomas of the lung (LAD), 51 ductal breast carcinomas (DBC), and 29 lobular breast carcinomas (LBC). All cases were stained for mammaglobin, Napsin A, TTF-1, ER, PR, and GCDFP-15. The IHC stains were interpreted to be positive if 5% or more of the malignant cells stained.

Results: 92.5% of LAD were positive for Napsin A, while only 11.5% of LBC and 8.3% of DBC showed positivity. 68% of LBC and 53% of DBC were positive for mammaglobin. However, 27.5% of LAD also showed mammaglobin positivity. TTF-1 was positive in 92.3% of LAD and was negative in all studied cases of breast carcinoma. ER was positive in 100% of LBC, 84.8% of DBC, and 26.8% of LAD. PR was positive in 63.6% of LBC, 61.4% of DBC, and 22.5% of LAD. GCDFP-15 was positive in 68% of LBC, 64.6% of DBC, and 32.5% of LAD.

Conclusions: TTF-1 was the best marker for LAD. Napsin A was sensitive for LAD,

however, staining was seen in a small percentage of LBC and DBC. Mammaglobin was moderately sensitive for breast carcinoma but not specific, since staining was seen in over 1/4 of the cases of LAD. ER, PR, and GCDFP-15 were most sensitive for LBC, but also were not specific for breast carcinoma. We conclude that mammaglobin was not very helpful to differentiate breast from lung adenocarcinoma, but Napsin A should be included in the panel as a marker for LAD.

APÊNDICE B - TRABALHO PUBLICADO EM REVISTA CIENTÍFICA

“CAN WE TELL THE SITE OF ORIGIN OF METASTATIC SQUAMOUS CELL CARCINOMA? AN IMMUNOHISTOCHEMICAL TISSUE MICROARRAY STUDY OF 194 CASES”

Pereira, Telma C.; Share, Sarah M.; Magalhães, Albino V.; Silverman, Jan F.

Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 19(1):10-14, January 2011

Abstract

To the workup of metastatic squamous cell carcinoma (SCC) of unknown primary, we studied an immunohistochemical panel including thyroid transcription factor (TTF-1), napsin A, villin, CDX-2, K903, CK5/6, p63, p16, CK7, and CK20. Using tissue microarray, we compared 194 SCC cases from the following sites: 35 lung, 34 skin, 14 cervix, 4 vagina, 16 vulva, 8 penis, 9 anus, 3 rectum, 10 esophagus, 4 bladder/urethra, and 57 SCC from various head and neck sites. p63 and K903 stained positively in 100% of cases, and CK5/6 in nearly 100% of cases, with the exception of 1 lung. CK7 was positive in 31.6% of all cases, with varying positivity according to the site. CK20 was negative in all cases except 1 lung. Napsin A was positive in 25.8% of lung, 7.7% of skin, 37.5% of penis, and 13.3% of tongue, and negative in all other sites. TTF-1 was positive only in 1 lung. p16 positivity ranged from 21.43% in vulva, to 75% in vagina and anus, and it was negative in lung, penis, bladder/urethra, and some head and neck. CDX-2 was negative in all cases except 1 vulva. Villin was negative in all cases. We conclude that immunohistochemistry has very limited value in determining the primary site of metastatic SCC. If lung is in the differential versus head and neck, esophagus, anorectal, or genital SCC, a panel including TTF-1, napsin A and p16 may be helpful, since positive TTF-1 and/or napsin A would favor lung primary, and positive p16 would favor an extrapulmonary site.

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética (Institutional Review Board) do Allegheny General Hospital, Pittsburgh, PA, Estados Unidos, conforme documento abaixo:



**ALLEGHENY
GENERAL HOSPITAL**

WEST PENN ALLEGHENY HEALTH SYSTEM

320 EAST NORTH AVENUE, PITTSBURGH, PA 15212-4772

412-359-3156

**INSTITUTIONAL REVIEW BOARD #01
FWA00009149**

July 30, 2008

Telma Pereira, M.D.
Department of Pathology

RE: **RC-4638 "Immunohistochemical Study of Site-Specific Markers of Carcinomas"**

Dear Dr. Pereira:

The Institutional Review Board (IRB) of Allegheny General Hospital is in receipt of the above-referenced protocol.

The IRB has reviewed the information and determined that the above-referenced protocol is **approved** "with a waiver of informed consent" and a "waiver of HIPAA authorization".

This protocol has been reviewed via the "expedited review" process (Category # 5) and approved in accordance with Institutional, Federal and State regulations by the IRB. It is the responsibility of the investigator to obtain any other necessary approvals prior to implementation of the research (AGH and/or ASRI).

Your approved protocol will be subject to review within one year from the date of initial review by the IRB.

Please present a copy of this approval letter to the Medical Record Department staff when you are requesting the medical records prior to starting this study.

Attached is a *Research Disclosure Log of Protected Healthcare Information* to be used to track anytime a disclosure is made about any of the subjects and a *Final Report* to be submitted to the IRB Office at completion of this study.

Please be aware of the record keeping responsibilities involved in your protocol. A copy of the *Principal Investigator Responsibilities* is also attached for your use.

Sincerely,

David A. Dean, M.D.
Vice-Chairman
Institutional Review Board

DAD/jss