



Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**SENSIBILIDADE DOS MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS PARA O  
DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA EM LAVADO PERITONEAL E LÍQUIDOS  
PLEURAL, ASCÍTICO E PERICÁRDICO**

ISABELA PERES

Brasília-DF  
2018

ISABELA PERES

SENSIBILIDADE DOS MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS PARA O  
DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA EM LAVADO PERITONEAL E LÍQUIDOS  
PLEURAL, ASCÍTICO E PERICÁRDICO

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências  
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Pirani Carneiro

Brasília  
2018

*Aos meus pais, Edson e Rejane.*  
*Aos meus irmãos, Luciana, Rayanna e Paulo André.*  
*Ao meu filho Pietro.*  
*Ao Andrei.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus queridos colegas e amigos de residência Rafael Nunes Pena e Lêda Maria Santos Rufino, pelo companheirismo e amizade.

A todos os preceptores, *staffs* e funcionários do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília, pelo aprendizado e a acolhida.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Soares Takano, pelo conhecimento repassado, dedicação ao trabalho e pelo altruísmo com o qual ensina a Patologia, ensinamentos que levo e levarei comigo todos os dias.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pela dedicação acadêmica, pelo conhecimento e pelo exemplo de perseverança.

A todos da equipe do Laboratório MICRA, onde aprimorei meus conhecimentos junto de pessoas tão queridas.

A equipe do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, pelo trabalho desenvolvido.

A minha querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Pirani Carneiro, pelo apoio incondicional, incentivo, dedicação, acolhida, confiança e por não ter desistido de mim, mesmo quando eu tinha.

Muito obrigada.

*“Começamos por habituar o educando a olhar qualquer determinado pormenor de um conjunto, (...) e a descrevê-los, em seguida, com rigor, o que exige, de sua parte, muita atenção. Ao fim de algum tempo, ele perceberá as mínimas diferenças existentes entre partes de coisas quase semelhantes. Passar-se-á, em seguida, a outros pormenores dos mesmos objetos. Depois (...), o aluno terá aprendido a ver, num relance, isto é, inconscientemente, as diferenças existentes entre grupos de formas perante as quais antigamente passaria indiferente.”*

*Gustavo Le Bon*

## RESUMO

A citologia de efusões (líquido pleural, líquido ascítico e líquido pericárdico) e lavado peritoneal é um procedimento de rotina no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com cânceres. O “cellblock” é um dos métodos de preparo de amostras citológicas e apresenta algumas vantagens em relação ao citocentrifugado. A imunocitoquímica é um método complementar à citologia para auxílio no diagnóstico. O painel de marcadores imunocitoquímicos usado na diferenciação entre células mesoteliais e epiteliais malignas é amplo e de custo elevado. Considerando as implicações prognósticas e terapêuticas do diagnóstico do carcinoma em líquidos e lavados, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade dos principais marcadores imunocitoquímicos de carcinoma nas amostras enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica visando aplicação na prática clínica. O presente trabalho constitui-se em um estudo observacional e transversal no qual foram analisadas amostras de efusões e de lavados peritoneais enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília – HUB nos anos de 2013 e 2017. As amostras foram preparadas por “cell block” usando o método plasma-tromboplastina. Foram usados os marcadores: Claudin-4, MOC-31, Ber-EP4, CEA, IMP3 e p16. O diagnóstico de carcinoma foi estabelecido pela identificação de, pelo menos, dois dos seguintes marcadores: MOC-31, Claudin-4, Ber-Ep4, CEA e IMP3. Um total de 51 amostras de líquidos/lavados com diagnóstico citológico e imunocitoquímico de carcinoma metastático foram analisadas. Os sítios primários mais frequentes dos carcinomas foram ovário (28,57%), mama (26,19%) e pulmão (19,04%). Claudin-4 foi o marcador de maior sensibilidade (100%). MOC-31 foi o segundo marcador de maior sensibilidade (98%). As sensibilidades dos marcadores Ber-Ep4, p16, IMP3 e CEA foram, respectivamente, 80%, 71,73%, 62,16% e 45,45%. Claudin-4 e MOC-31, considerando a elevada sensibilidade e a expressão em carcinomas de diferentes sítios primários e tipos histológicos, são os marcadores mais indicados para a detecção de carcinoma em líquidos/lavados.

**Palavras-chave:** imunocitoquímica, citologia, *cellblock*, MOC-31, Claudin-4, efusões, líquidos e lavado peritoneal.

## ABSTRACT

The cytology of effusions (pleural fluid, ascitic fluid and pericardial fluid) and peritoneal washes is a routine procedure in the diagnosis and follow-up of patients with cancers. Cellblock is one of the methods of preparation of cytological samples and has some advantages over cytocentrifugation. Immunocytochemistry is a complementary method to cytology to aid in diagnosis. The panel of immunocytochemical markers used in the differentiation between mesothelial and malignant epithelial cells is large and costly. Considering the prognostic and therapeutic implications of the diagnosis of carcinoma in liquids and washes, the objective of this study was to evaluate the sensitivity of the main immunocytochemical markers of carcinoma in the samples sent to the Laboratory of Pathology for clinical application. The present study is an observational and cross-sectional study in which effusions and peritoneal washes sent to the Laboratory of Pathological Anatomy of the Hospital Universitário de Brasília (HUB) in the years of 2013 and 2017 were analyzed. The samples were prepared in cellblock by the plasma-thromboplastin method. Claudin-4, MOC-31, Ber-EP4, CEA, IMP3 and p16 were used. The diagnosis of carcinoma was established by the identification of at least two of the following markers: MOC-31, Claudin-4, Ber-Ep4, CEA and IMP3. A total of 51 liquid / washes samples with cytological and immunocytochemistry diagnosis of metastatic carcinoma were analyzed. The most frequent primary sites of carcinomas were ovarian (28.57%), breast (26.19%) and lung (19.04%). Claudin-4 was the most sensitive marker (100%). MOC-31 was the second most sensitive marker (98%). The sensitivity of Ber-Ep4 was 80%, p16 was 71.73%, IMP3 was 62.16% and CEA was 45.45% in total samples. Claudin-4 and MOC-31, considering the high sensitivity and expression in carcinomas of different primary sites and histological types, are the most indicated markers for the detection of carcinoma in liquids / washes.

**Key words:** immunocytochemistry, cytology, cellblock, MOC-31, Claudin-4, effusions, liquids and peritoneal washes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Método “plasma-tromboplastina” .....18
- Figura 2** - Imunocitoquímica para claudin-4. Expressão em membrana e citoplasma de células de adenocarcinoma de pulmão (A, 200x), de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (C,400x) e de carcinoma urotelial de bexiga (D,200X).....31
- Figura 3** - Imunocitoquímica para MOC-31. Expressão em membrana e citoplasma de células de adenocarcinoma de mama (A, 200x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (B, 400x) e de carcinoma urotelial de bexiga (C, 200X); Ausência de expressão em carcinoma epidermoide de colo de útero (D, 100x).....32
- Figura 4** - Imunocitoquímica para Ber-EP4. Expressão em membrana e citoplasma de células de adenocarcinoma de ovário (A, 200x) e de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x). Ausência de expressão em carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e em carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X).....33
- Figura 5** - Imunocitoquímica para p16. Expressão em citoplasma e núcleo de células de adenocarcinoma de ovário (A, 200x), de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e de carcinoma urotelial (D, 200X).....34
- Figura 6** - Imunocitoquímica para IMP3. Expressão em citoplasma de células de adenocarcinoma de ovário (A, 200x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x), de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x). Ausência de expressão em carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X).....35
- Figura 7** - Imunocitoquímica para CEA. Expressão em citoplasma de células de adenocarcinoma de estômago (A, 200x) e de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x). Ausência de expressão em carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e em carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X).....36



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Anticorpos primários usados na imunocitoquímica e seus respectivos fabricantes clones, diluições, controles.....27
- Tabela 2** - Frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com carcinoma.....28
- Tabela 3** - Frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com carcinoma de sítio primário conhecido e desconhecido.....28
- Tabela 4** - Frequência dos sítios primários entre as amostras de carcinoma de sítio primário conhecido.....29
- Tabela 5** - Distribuição dos sítios primários de acordo com o tipo de líquido/lavado.....29
- Tabela 6** - Sensibilidade dos marcadores de carcinoma no total de amostras de líquido/lavado e de acordo com o sítio primário do carcinoma.....30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP-FM .....	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB
DAB .....	3-4, Diaminobenzidina
DH <sub>2</sub> O .....	Água Destilada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Peróxido de Hidrogênio
HE .....	Hematoxilina e Eosina
HUB .....	Hospital Universitário de Brasília
INCA .....	Instituto Nacional do Câncer
LSAB .....	Labelled Streptavidin Biotin
PBS .....	Phosphate Buffered Saline
RPM .....	Rotação Por Minuto
TBS .....	Tris Buffered Saline

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 CITOLOGIA.....	15
2.2 “CELLBLOCK”.....	16
2.3 MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS.....	19
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>4 MÉTODO.....</b>	<b>22</b>
4.1 AMOSTRAS.....	22
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS - “CELLBLOCK”.....	22
<b>4.2.1 Método “plasma-tromboplastina”.....</b>	<b>22</b>
4.2.1.1 Indicação.....	22
4.2.1.2 Material.....	22
4.2.1.3 Técnica.....	23
4.2.1.4 Observações.....	23
<b>4.2.2 Método “ágar”.....</b>	<b>24</b>
4.2.2.1 Indicação.....	24
4.2.2.2 Material.....	24
4.2.2.3 Técnica.....	24
4.2.2.4 Observações.....	25
4.3 IMUNOCITOQUÍMICA.....	25
<b>4.3.1 Técnica.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.2 Análise imunocitoquímica.....</b>	<b>27</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>

<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o biênio 2018-2019, o Brasil deverá registrar 600 mil novos casos de câncer<sup>1</sup>. A citologia de amostras de efusões (líquido pleural, peritoneal e pericárdico) e lavado peritoneal é um procedimento de rotina no diagnóstico, estadiamento e seguimento de pacientes com câncer<sup>2</sup>.

O “cellblock” é um dos métodos de preparo de amostras citológicas e apresenta algumas vantagens em relação ao citocentrifugado<sup>3</sup>.

Apesar de ser considerada um método diagnóstico acessível, rápido, de baixo custo e pouco invasivo, a citologia apresenta limitações, sendo muitas vezes difícil diferenciar, neste exame, as células benignas das malignas ou mesmo identificar a origem de uma célula neoplásica<sup>4,5</sup>.

A imunocitoquímica é um método complementar à citologia para auxílio no diagnóstico<sup>4,5</sup>. Os marcadores imunocitoquímicos usados na pesquisa de carcinomas em efusões e lavado peritoneal podem ser divididos nos seguintes grupos: 1) marcadores de células mesoteliais; 2) marcadores de células epiteliais; 3) marcadores de malignidade/proliferação celular; 4) marcadores de transição epitelial-mesenquimal/“stemcell” e 5) marcadores de sítio primário.

O painel de marcadores imunocitoquímicos usado na diferenciação entre células mesoteliais e epiteliais malignas é amplo e de custo elevado. Considerando as implicações prognósticas e terapêuticas do diagnóstico do carcinoma em líquidos e lavados, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade dos principais marcadores imunocitoquímicos de carcinoma em amostras de líquidos e lavado peritoneal enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica visando aplicação na prática clínica.

O exame morfológico das amostras citológicas de efusões não é uma ferramenta isolada de alta sensibilidade na distinção entre células malignas e células mesoteliais reativas. A imunocitoquímica é comumente um método utilizado para aumentar a sensibilidade e especificidade diagnóstica.

Um dos maiores desafios na rotina diagnóstica em citologia de efusões e líquidos é a distinção entre adenocarcinomas, mesotelioma e células mesoteliais reativas. Muitos estudos investigaram marcadores para células

mesoteliais reativas e adenocarcinomas, mas nenhum encontrou um marcador diagnóstico inequívoco para ambos.

## 2 REVISÃO DA LITERTURA

### 2.1 CITOLOGIA

Os tipos celulares geralmente identificados na citologia de efusões ou líquidos cavitários (pleural, peritoneal e pericárdico) e de lavado peritoneal são as células mesoteliais, macrófagos e leucócitos<sup>6,7,8</sup>.

As células mesoteliais são células epiteliais especializadas que revestem as cavidades serosas (pleural, pericárdico e peritoneal) e sofrem hipertrofia e hiperplasia em resposta a uma ampla variedade de estímulos<sup>6,7,8</sup>. Na presença de um derrame, qualquer que seja sua causa, as células mesoteliais esfoliam, muitas vezes em grande número, como células isoladas ou como aglomerados coesos de células<sup>6,7,8</sup>. Estas células podem formar arranjos e apresentar atipias celulares que tornam difícil distingui-las das células epiteliais malignas<sup>6,7,8</sup>.

As efusões associadas ao câncer são resultado de obstrução venosa causada por neoplasia, de alterações inflamatórias secundárias à neoplasia e de secreção produzida pela própria neoplasia. Nesses derrames, o número de células neoplásicas pode variar consideravelmente, e, geralmente, contêm células benignas (mesoteliais, macrófagos e leucócitos), que, frequentemente, estão em maior número que as células neoplásicas<sup>6,7,8</sup>.

A maioria das neoplasias nas efusões serosas são do tipo adenocarcinomas, carcinomas de pequenas células, carcinomas de células escamosas queratinizantes, melanomas e linfomas<sup>6,7,8</sup>. Os adenocarcinomas são o tipo mais comum de células neoplásicas encontradas nas efusões serosas<sup>6,7,8</sup>. A maioria das células de adenocarcinoma nas efusões serosas tem origem em adenocarcinomas da mama, pulmão ou ovário<sup>6,7,8</sup>. As células podem mostrar as características clássicas do adenocarcinoma tais como grupos coesos compostos de células grandes com núcleos excêntricos, com nucléolos proeminentes e citoplasma vacuolado<sup>6,7,8</sup>. Entretanto, células de adenocarcinoma em efusões apresentam grande variação morfológica, não apenas nas células, mas também no seu grau de organização<sup>6,7,8</sup>. Células de adenocarcinoma podem estar isoladas ou agrupadas formando estruturas

papilares ou esferas. Não é possível, apenas pela análise morfológica, sugerir o sítio primário do adenocarcinoma<sup>6,7,8</sup>.

## 2.2 “CELL BLOCK”

“Cellblock” consiste em uma forma de preparação citológica na qual o precipitado da amostra centrifugada é incluído em parafina e submetido a processamento histológico habitual<sup>6,7,8</sup>.

Na rotina diagnóstica, o “cellblock” é um método complementar ao citocentrifugado no preparo de amostras de citologia esfoliativa (efusões/líquidos das cavidades pleural, peritoneal e pericárdica, lavados peritoneal e broncoalveolar e liquor) e citologia aspirativa<sup>6,7,8</sup>.

O método utiliza técnicas histológicas para o processamento e, portanto, oferece como vantagem: várias seções do mesmo material podem ser coradas com corantes de rotina, como hematoxilina e eosina, ou com colorações especiais para a identificação de mucina, melanina, bactérias e fungos e, além disso, podem servir para imunocitoquímica<sup>6,7,8</sup>. O benefício adicional da técnica de “cellblock” é a presença de resíduos sólidos que permitem o reconhecimento de padrões histológicos da lesão que não podem ser identificados em esfregaços e citocentrifugados<sup>6,7,8</sup>.

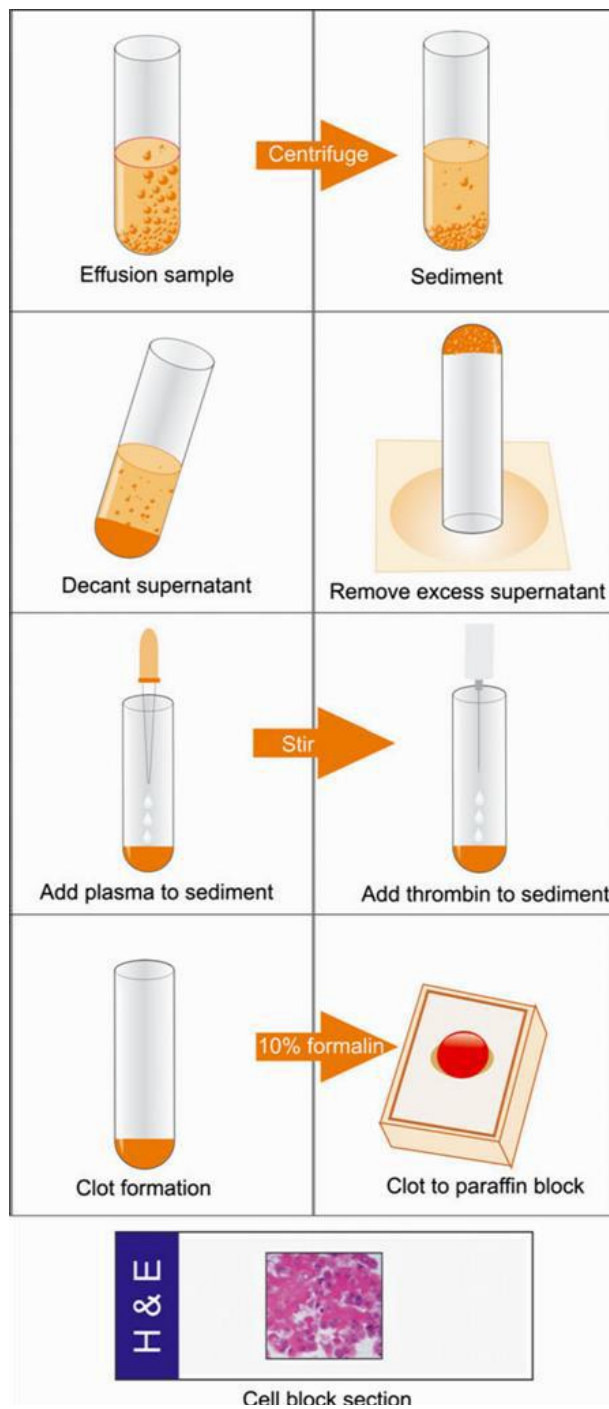
Nas amostras em que há necessidade de realização de imunocitoquímica, o “cellblock” apresenta algumas vantagens em relação ao citocentrifugado: facilidade de interpretação morfológica, menor relação custo-benefício, possibilidade de realização de maior número reações imunocitoquímicas e de arquivamento do bloco de parafina para uso em técnicas futuras<sup>9-15</sup>.

As amostras citológicas, mais frequentemente enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica, nas quais o “cellblock” pode ser usado são as efusões (líquido pleural, ascítico e pericárdico), lavados (peritoneal e broncoalveolar), liquor, aspirados de lesões císticas e amostras citológicas em meio líquido.



Vários métodos de preparo de “cellblock”, com uso de diferentes substâncias, são usados: “agar”, “HistoGel”, “collodion” e “plasma-tromboplastina/trombina”<sup>16-25</sup>. O preparo automatizado do “cellblock” também tem sido utilizado<sup>25-31</sup>. Há uma variação significativa na descrição de cada técnica com relação à fixação da amostra, volume e concentração das substâncias empregadas, o que dificulta comparar a eficácia dos métodos. Dentre estes, os mais usados são os métodos “agar” e “plasma-tromboplastina/trombina”.

Dentre os métodos de preparação de “cellblock” descritos, o método “plasma-tromboplastina/trombina” (figura 1) tem sido considerado uma técnica de fácil execução e de melhor qualidade para aplicação de imunocitoquímica<sup>32-36</sup>. Atualmente, na maioria nos laboratórios de Anatomia Patológica, apenas parte das amostras é citocentrifugada e o “cellblock” é preparado apenas daquelas amostras que apresentam resíduos sólidos. Ao adicionar plasma e tromboplastina nos precipitados dos centrifugados, possibilita-se a formação de coágulos contendo células da amostra, os quais podem ser incluídos em parafina. Através deste método “plasma-tromboplastina/trombina”, a princípio, qualquer e toda a amostra poderia ser arquivada e ser utilizada para estudo imunocitoquímico.



**Figura 1** - Método "plasma-tromboplastina".

Fonte: Jain e col. (2014).

## 2.3 MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS

O painel imunocitoquímico usado para o diagnóstico de adenocarcinoma em líquidos pleurais e lavado peritoneal inclui marcadores de células mesoteliais (WT-1, calretinina, HBME, D2-40, etc), marcadores “epiteliais” (MOC-31, Ber-EP4, CEA, Claudin-4, B72.3) e outros como IMP3 e CD15, já que nenhum marcador, isoladamente, tem alta sensibilidade e especificidade para diferenciar as células epiteliais malignas das mesoteliais<sup>37-41</sup>. No contexto de pacientes com história prévia de carcinoma, marcadores específicos do sítio primário, como TTF-1 (para pulmão e tireoide), CDX-2 (para o cólon) e RE (para mama) podem auxiliar no diagnóstico<sup>42-44</sup>.

No presente estudo, foram usados os seguintes marcadores: Claudin-4, MOC-31, Ber-EP4, CEA, IMP3 e p16.

Claudin-4 é parte de uma família de proteínas transmembranas que está associada à junção intercelular e sua expressão ocorre na maioria das células epiteliais<sup>45,46</sup>. As proteínas da família “Claudin” compreendem mais de 20 membros constituintes funcionais importantes de junções intercelulares<sup>45,46</sup>. Eles estão presentes nas interfaces celulares epitélio e endotelial e contribuem para a adesão mecânica, controle do fluxo de íons, manutenção da polaridade das células e para recrutamento de proteínas de sinalização, elas podem ainda regular proliferação e diferenciação celular<sup>47</sup>. A expressão imuno-histoquímica e imunocitoquímica de claudin-4 em adenocarcinoma tem sido usada no diagnóstico diferencial com mesotelioma maligno e células mesoteliais reativas, com alta sensibilidade e especificidade, em amostras teciduais e citológicas<sup>48-54</sup>.

O anticorpo MOC-31 reconhece o domínio extracelular da molécula de adesão celular epitelial (Ep-CAM) presente na membrana de células epiteliais<sup>55</sup>. Este anticorpo tem sido usado para distinguir células mesoteliais de adenocarcinomas em fluidos de efusão<sup>56-61</sup>.

Ber-EP4 é um anticorpo monoclonal que, assim como o MOC-31, reconhece o domínio extracelular da molécula de adesão celular epitelial (Ep-CAM) presente na membrana de células epiteliais, mas não em células mesoteliais reativas ou malignas<sup>39,50,57,62</sup>. Um número crescente de estudos

tem mostrado a capacidade deste anticorpo para ser um marcador no diagnóstico diferencial entre adenocarcinomas e células mesoteliais malignas ou reativas.

O anticorpo monoclonal IMP3 (Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3) reage contra um membro da família de proteínas de ligação a mRNA do fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II)<sup>63</sup>. Esta proteína regula transcritos do fator de crescimento semelhante à insulina tipo II durante a embriogênese e mais tarde é expressa em uma proporção de células de vários tipos de tumores. IMP3 é uma proteína que está envolvida na carcinogênese e é considerada um indicador de mau prognóstico para numerosos tumores malignos como o melanoma e carcinoma colorretal, prostático, hepatocelular, urotelial, renal, pulmonar, oral, pancreático, de cabeça e peçoço e cervical<sup>64-73</sup>.

O CEA (carcinoembryonic antigen) é um componente glicoproteico do epitélio que é expresso em vários tumores especialmente aqueles de origem epitelial. Em estudos recentes tem sido usado na diferenciação entre carcinomas e células mesoteliais reativas e malignas<sup>74-79</sup>.

A proteína p16 é membro da família Ink4, inibidor da ciclina dependente de quinase 4 e possui atividade biológica antiproliferativa. A superexpressão desta proteína tem sido observada principalmente em tumores associados à infecção pelo HPV, anogenitais e de cabeça e pesçoço<sup>80</sup>. Em efusões, a proteína é positiva em mesotelioma e usada para diferenciar células mesoteliais reativas de mesoteliais malignas<sup>81,82</sup>.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade dos principais marcadores de carcinoma em amostras de líquidos e lavado peritoneal.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Avaliar a frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com carcinoma.

- . Avaliar a frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com carcinoma de sítio primário conhecido e desconhecido.

- . Avaliar a frequência dos sítios primários entre as amostras de carcinoma com sítio primário conhecido.

- . Avaliar a distribuição dos sítios primários de acordo com o tipo de líquido/lavado.

- . Avaliar a sensibilidade de Claudin-4, MOC-31, Ber-Ep4, p16, IMP3 e CEA para identificação de carcinoma no total de amostras, de acordo com o sítio primário do carcinoma e de acordo com o tipo histológico do carcinoma.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

O presente trabalho constitui-se em um estudo observacional e transversal no qual foram analisadas amostras citológicas de líquidos (pleural, ascítico e pericárdico) e de lavados peritoneais enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília – HUB nos anos de 2013 e 2017.

#### Critérios de Inclusão.

Foram incluídas amostras de líquidos (pleural, ascítico e pericárdico) e de lavados peritoneais com diagnóstico citológico e imunocitoquímico de metástase de carcinoma de sítio primário conhecido ou desconhecido.

#### Critérios de Exclusão.

Foram excluídas do estudo as amostras de pacientes menores do que 18 anos, indígenas, incapazes, e casos de negativa na participação do estudo.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM, CAAE: 34150314.9.0000.5558

### 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS - “CELLBLOCK”

#### **4.2.1 Método “plasma-tromboplastina”**

4.2.1.1 Indicação: Amostras sem ou com pequena quantidade de sedimento e amostra com sedimento de sangue (sem anticoagulante).

4.2.1.2 Material:

- . Plasma humano
- . Tromboplastina (NEOPLASTINE r CI PLUS 5)

- . Tubo Falcon de 15ml.
- . Micropipetas
- . Ponteiras
- . Formol a 10%

#### 4.2.1.3 Técnica:

- 1) Retirar o plasma previamente para descongelar.
- 2) Centrifugar a amostra por 5 minutos a 1500 RPM
- 3) Desprezar o sobrenadante com a pipeta
- 4) Adicionar 50µl de plasma no precipitado e homogeneizar
- 5) Adicionar 50µl de tromboplastina e homogeneizar por cerca de minuto
- 6) Deixar o coágulo se formar em até 2 minutos
- 7) Quando o coágulo não se formar, repetir a técnica ou usar o método “agar”
- 8) Após a formação do coágulo adicionar 2ml de formol no frasco para promover o deslocamento do coágulo do fundo do frasco e fixação da amostra.
- 9) Retirar o coágulo do frasco, envolver em papel manteiga e colocar em cassete para processamento histológico habitual e coloração pela Hematoxilina-eosina (HE).

#### 4.2.1.4 Observações:

- 1) Se a amostra foi fixada com o álcool ou enviada com anticoagulante, o sedimento deve ser lavado várias vezes com uma solução salina ou PBS, uma vez que estas substâncias inibem a coagulação com plasma e tromboplastina.
- 2) Nas amostras incolores, recomenda-se colocar eosina no coágulo antes do processamento histológico para facilitar a inclusão.
- 3) O plasma usado na técnica foi obtido no laboratório de hematologia, distribuído em “ependorfs” e preservado no

congelador por até 3 meses. Alguns minutos antes do uso, o plasma era mantido em temperatura ambiente até se tornar líquido.

#### **4.2.2 Método “ágar”**

4.2.2.1 Indicação: Amostras com grande quantidade de sedimento.

4.2.2.2 Material:

- . Ágar (Ágar bacteriológico- Himedia)
- . Tubo Falcon de 15ml.
- . Micropipetas
- . Ponteiras
- . Formol

4.2.2.3 Técnica:

- 1) Preparo do Agar: 1% a 5% (dissolver 1 a 5g de ágar bacteriano em 100 ml de água fervente)
- 2) Centrifugar a amostra por 5 minutos a 1500 RPM
- 3) Desprezar o sobrenadante com a pipeta
- 4) Adicionar de 200µl a 500µl de ágar no precipitado (de acordo com a quantidade de sedimento) e homogeneizar por cerca de 1 minuto.
- 5) Após a formação do gel acrescentar 2ml de formol no frasco para promover o deslocamento do gel do fundo do frasco e fixação da amostra.
- 6) Remover o gel do frasco e colocar em cassete para processamento histológico habitual e coloração pela Hematoxilina-eosina (HE).



#### 4.2.2.4 Observações:

- 1) O ágar dissolvido deve ser colocado em frascos de vidro estéreis com uma tampa de rosca. A tampa do frasco deve ser fechada frouxamente até resfriamento e endurecimento e, em seguida, completamente fechada e o frasco armazenado em uma geladeira. Quando for usar, derreter o ágar em um banho de água a 60 ° C.
- 2) Descartar o ágar não utilizado no final do dia.

### 4.3 IMUNOCITOQUÍMICA

#### 4.3.1 Técnica

As reações imunocitoquímicas foram realizadas em “cellblocks” preparados das amostras seguindo as seguintes etapas:

- 1) Recuperação antigênica: Realizada com de tampão citrato (10mM - pH6,0) em vaporizador (Steamer) entre 96 a 99°C, por 20 min, com as lâminas submersas neste tampão.
- 2) Resfriamento à temperatura ambiente, imersas no tampão citrato por 20min ou até o tampão estiver na temperatura de 50 °C.
- 3) Lavagem das lâminas em água destilada em cinco banhos.
- 4) Bloqueio da peroxidase endógena: com peróxido de hidrogênio + DH<sub>2</sub>O na proporção de 26ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para 230ml de DH<sub>2</sub>O – 2 banhos de 15 minutos.
- 5) Lavagens em água destilada em três banhos.
- 6) Imersão em tampão TBS (Tris buffered Saline) + tween, e remoção do excesso de TBS + tween nas lâminas com papel toalha para serem submetidas à imunocoloração.
- 7) Incubação das lâminas contendo as amostras com o anticorpo primário em câmara úmida overnight (18 horas) sob refrigeração (2-8°

C). O clone, fabricante e a diluição dos anticorpos utilizados são apresentados na Tabela 1.

8) Lavagem das lâminas com TBS + tween a fim de retirar o excedente de anticorpo do material em 3 banhos de 3min minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.

9) Incubação com o anticorpo secundário biotilado (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a temperatura ambiente (ar condicionado 18 a 22°C).

10) Lavagem das lâminas com TBS + tween em 3 banhos de 5 minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.

11) Incubação com o complexo streptavidina-peroxidase (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a temperatura ambiente (ar condicionado 18 a 22°C) durante 30 minutos.

12) Lavagem das lâminas com TBS + tween em 3 banhos de 5 minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.

13) Revelação: a imunocoloração foi desenvolvida pela adição de substrato cromogênicodiaminobenzidina (DAB) (100mg%) com tampão de diluição.

14) Lavagem em água destilada.

15) Contra coloração com Hematoxilina de Harris.

16) Lavagens em água corrente.

17) Desidratação em banhos de álcool (5 banhos).

18) Diafanização em banhos de xilol (4 banhos).

19) Montagem com meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Alemanha) e lamínula.

Tabela 1. Anticorpos primários usados na imunocitoquímica e seus respectivos fabricantes clones, diluições, controles

Anticorpo	Marca Anticorpo	Clone	Diluição	Controle
Epithelial Related Antigen	DAKO	MOC-31	1:100	Mucosa intestinal
Claudin-4	NOVEX	3E2C1	1:100	Mucosa intestinal
Epithelial Antigen	DAKO	BerEp4	1:200	Mucosa intestinal
CEA	DAKO	II-7	1:50	Mucosa intestinal
IMP3	DAKO	69.1	1:500	Carcinoma gástrico
P16	ZETA	G175-405	1:50	Carcinoma cervical

#### 4.3.2 Análise imunocitoquímica

As lâminas coradas foram avaliadas independentemente por dois patologistas. A reação foi definida como positiva quando mais de 1% das células atípicas apresentaram marcação de intensidade moderada a intensa e de acordo com o padrão estabelecido pelo fabricante para cada marcador: MOC-31 (membrana e citoplasma), Claudin-4 (membrana e citoplasma), BerEp4 (membrana e citoplasma), CEA (citoplasma), IMP3 (citoplasma e núcleo), Calretinina (citoplasma e núcleo), HBME (membrana), CD68 (citoplasma) e LCA (membrana).

O diagnóstico de carcinoma foi estabelecido pela identificação de, pelo menos, dois dos seguintes marcadores: MOC-31, Claudin-4, BerEp4, CEA e IMP3.

## 5 RESULTADOS

Um total de 51 amostras de líquidos/lavados com diagnóstico citológico e imunocitoquímico de carcinoma metastático foram analisadas. A frequência dos tipos de líquido/lavado entre amostras está disposta na Tabela 2.

Tabela 2. Frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com carcinoma

Tipo de líquido/lavado	%
Líquido pleural	50,98% (26/51)
Líquido ascítico	33,33% (17/51)
Líquido pericárdico	9,8% (5/51)
Lavado peritoneal	5,88% (3/51)

Os sítios primários dos carcinomas eram conhecidos em 82,35% (42/51) das amostras. A frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com sítio primário de carcinoma conhecido e desconhecido está disposta na Tabela 3. Em todos os tipos de líquido/lavado, a maioria das amostras era de sítio primário conhecido. A maior frequência de carcinoma de sítio primário desconhecido foi observada em líquidos pleurais (30,76%).

Tabela 3. Frequência dos tipos de líquido/lavado entre as amostras com carcinoma de sítio primário conhecido e desconhecido.

	Líquido Pleural	Líquido Ascítico	Líquido pericárdico	Lavado peritoneal	Total
Sítio primário conhecido	69,23% (18/26)	94,11% (16/17)	100% (5/5)	100% (3/3)	82,35% (42/51)
Sítio primário desconhecido	30,76% (8/26)	5,88% (1/17)	0% (0/5)	0% (0/3)	17,64% (9/51)
Total	100% (26/26)	100%(17/17)	100% (5/5)	100% (3/3)	100% (51/51)

Os sítios primários conhecidos dos carcinomas metastáticos observados nos líquidos/lavados estão dispostos na Tabela 4. Os sítios primários mais frequentes dos carcinomas foram ovário (28,57%), mama (26,19%) e pulmão (19,04%).

Tabela 4. Frequência dos sítios primários entre as amostras de carcinoma de sítio primário conhecido

Sítio primário do carcinoma	N =42 (%)
Ovário	12 (28,57%)
Mama	11 (26,19%)
Pulmão	8 (19,04%)
Estômago	4 (9,52%)
Cólon	2 (4,76%)
Cólo de útero	2 (4,76%)
Pâncreas	1 (2,38%)
Endométrio	1 (2,38%)
Bexiga	1 (2,38%)

A distribuição dos sítios primários de acordo com o tipo de líquido/lavado está disposta na Tabela 5. A mama foi o sítio primário mais frequente dos carcinomas metastáticos em líquidos pleurais e pericárdicos e, o ovário, em líquidos ascíticos e lavados peritoneais.

Tabela 5. Distribuição dos sítios primários de acordo com o tipo de líquido/lavado

	Líquido pleural	Líquido ascítico	Líquido pericárdico	Lavado peritoneal
Ovário	11,11% (2/18)	43,75% (7/16)	0% (0/5)	100% (3/3)
Mama	44,44% (8/18)	0% (0/16)	60% (3/5)	0% (0/3)
Pulmão	33,33% (6/18)	12,5% (2/16)	0% (0/5)	0% (0/3)
Estômago	5,55% (1/18)	12,5% (2/16)	20% (1/5)	0% (0/3)
Cólon	0% (0/18)	12,5% (2/16)	0% (0/5)	0% (0/3)
Pâncreas	0% (0/18)	6,25% (1/16)	0% (0/5)	0% (0/3)
Colo de útero	0% (0/18)	6,25% (1/16)	20% (1/5)	0% (0/3)
Endométrio	5,55% (1/18)	0% (0/16)	0% (0/5)	0% (0/3)
Bexiga	0% (0/18)	6,25% (1/16)	0% (0/5)	0% (0/3)

Dentre os carcinomas de sítio primário conhecido, 92,85% (39/42) eram adenocarcinomas, os carcinomas restantes eram dos seguintes tipos histológicos: carcinoma escamoso de colo do útero (n=1), carcinoma de pequenas células do pulmão (n=1) e carcinoma urotelial de bexiga (n=1).

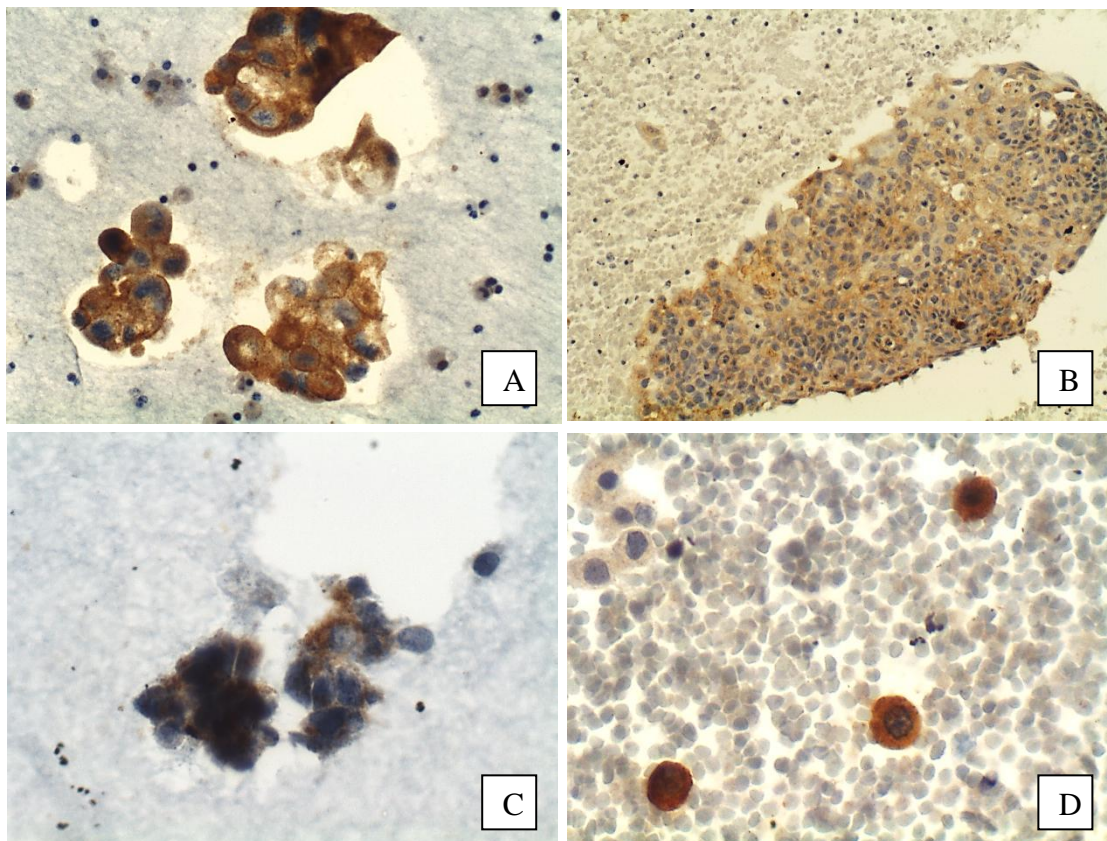
A sensibilidade de Claudin-4, MOC31, Ber-EP4, p16, IMP3 e CEA para a identificação de carcinomas no total de amostras de líquido/ lavado de acordo com o sítio primário do carcinoma está disposta na Tabela 6. Claudin-4 foi o marcador de maior sensibilidade (100%), a expressão deste marcador foi observada em todas as amostras de diferentes sítios primários. MOC-31 foi o segundo marcador de maior sensibilidade (98%), a expressão deste marcador não foi observada apenas em 1 amostra de carcinoma de colo de útero. A sensibilidade do Ber-Ep4 foi de 80% no total de amostras, de 100% em carcinoma de sítio primário em ovário e elevada em carcinomas de sítio primário em mama e estômago e moderada em carcinomas de pulmão. A sensibilidade do p16 foi de 71,73% no total de amostras, elevada nos carcinomas de sítio primário em ovário e pulmão, mas baixa nos carcinomas de mama e estômago. A sensibilidade do IMP3 foi de 62,16% no total de amostras, elevada em carcinoma de sítio primário em ovário, moderada em carcinomas de mama e estômago e baixa em carcinoma de pulmão. A sensibilidade do CEA foi de 45,45% no total de amostras, elevada em carcinomas de estômago, moderada em carcinomas de mama e pulmão e baixa em carcinomas de ovário.

Tabela 6. Sensibilidade dos marcadores de carcinoma no total de amostras de líquido/lavado e de acordo com o sítio primário do carcinoma

	Claudin-4	MOC-31	Ber-EP4	p16	IMP3	CEA
Total	100%(50/50)	98%(49/50)	80% (36/45)	71,73% (33/46)	62,16% (23/37)	45,45% (20/44)
Ovário	100% (12/12)	100% (11/11)	100% (11/11)	90% (9/10)	77,77% (7/9)	18,18% (2/11)
Mama	100% (10/10)	100% (11/11)	77,77% (8/10)	45,45% (5/11)	55,55% (5/9)	50% (5/10)
Pulmão	100% (8/8)	100% (8/8)	62,5% (5/8)	85,71% (6/7)	33,33% (2/6)	62,5% (5/8)
Estômago	100% (4/4)	100% (4/4)	75% (3/4)	33,33% (1/3)	66,66% (2/3)	75% (3/4)
Cólon	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)
Colo de útero	100% (2/2)	50% (1/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)
Pâncreas	100% (1/1)	100% (1/1)	-	0% (0/1)	-	-
Endométrio	100% (1/1)	100% (1/1)	-	-	-	-
Bexiga	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)

---

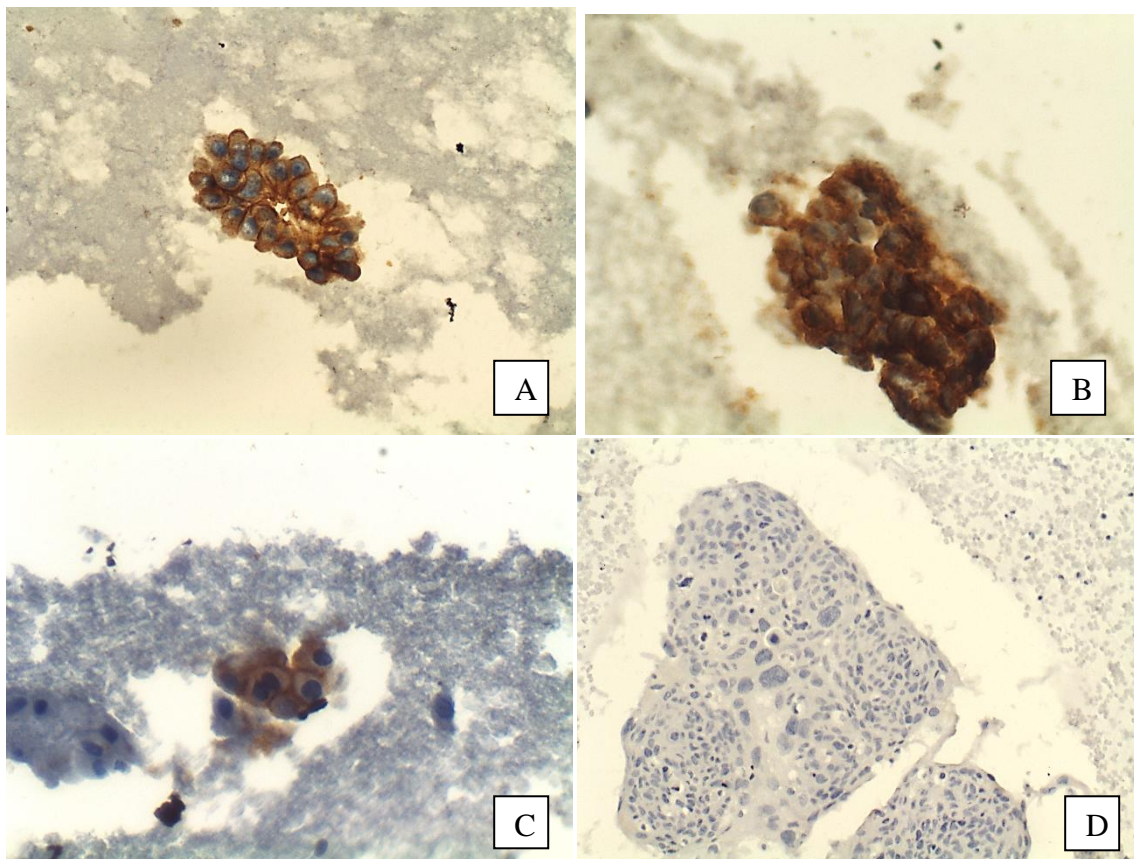
A expressão de Claudin-4 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e na amostra de carcinoma epidermoide, de carcinoma de pequenas células e de carcinoma urotelial. (Figura 2).



**Figura 2.** Imunocitoquímica para Claudin-4. Expressão em membrana e citoplasma de células de adenocarcinoma de pulmão (A, 200x), de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e de carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X)

A expressão de MOC-31 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e na amostra de carcinoma de pequenas células. Na amostra de carcinoma urotelial, a expressão foi moderada e em células esparsas e, na amostra de carcinoma epidermoide, não houve expressão.

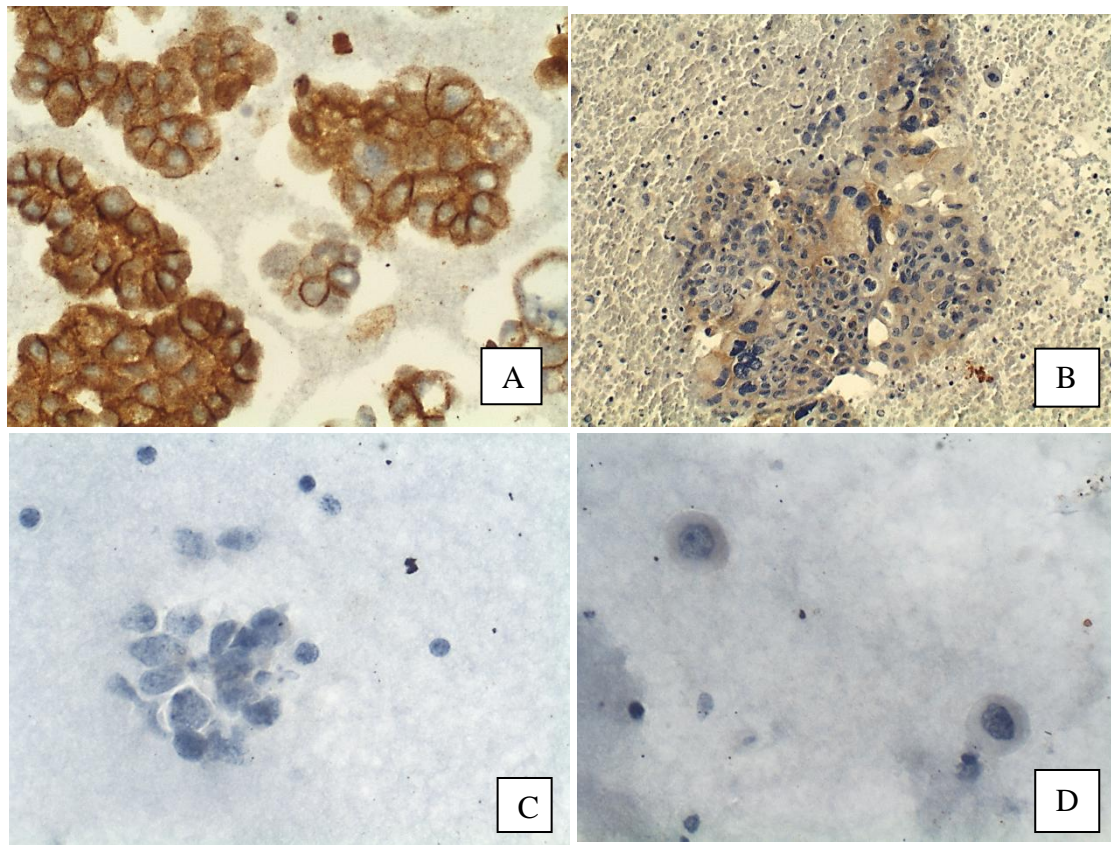
Figura 3.



**Figura 3.** Imunocitoquímica para MOC-31. Expressão em membrana e citoplasma de células de adenocarcinoma de mama (A, 200x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (B, 400x) e de carcinoma urotelial de bexiga (C, 200X); Ausência de expressão em carcinoma epidermoide de colo de útero (D, 100x)

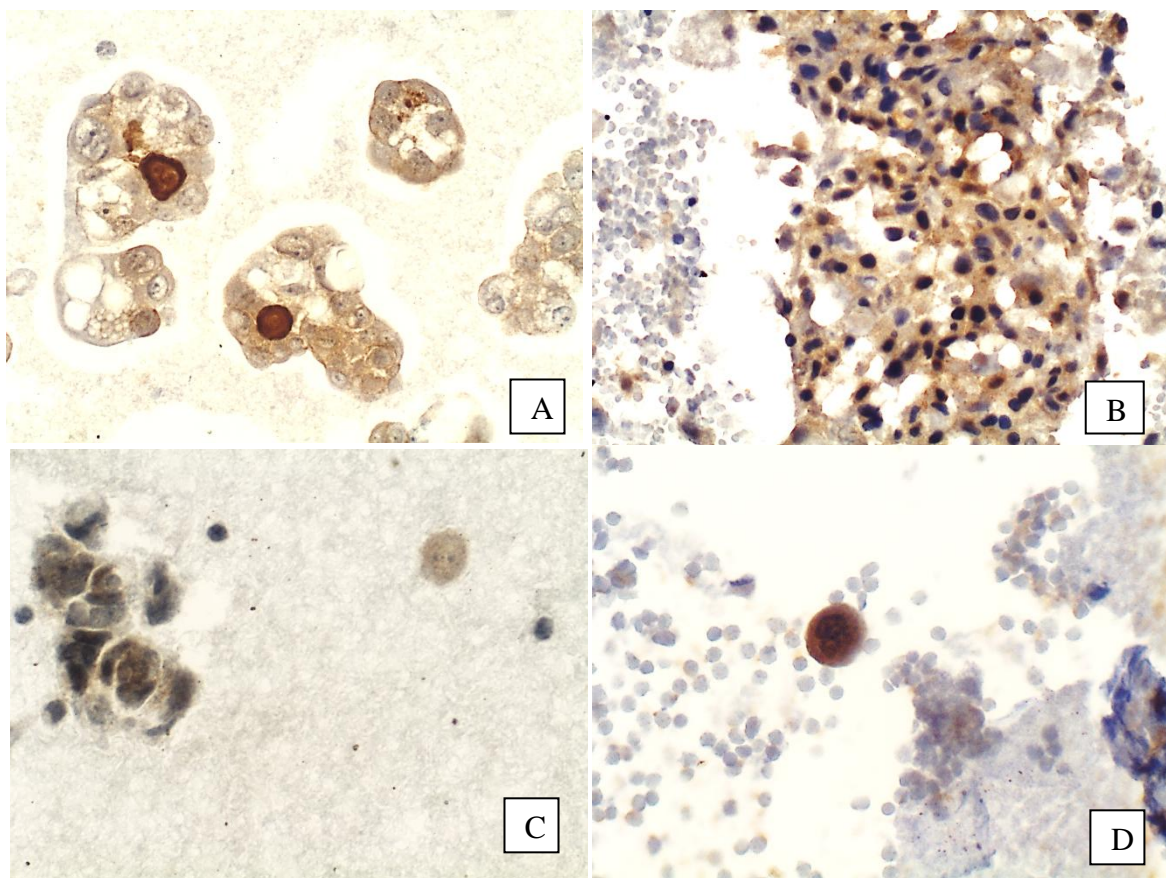


A expressão de Ber-EP4 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e moderada e difusa na amostra de carcinoma epidermoide. Não houve expressão em amostras de carcinoma de pequenas células e de carcinoma urotelial. Figura 4.



**Figura 4.** Imunocitoquímica para Ber-EP4. Expressão em membrana e citoplasma de células de adenocarcinoma de ovário (A, 200x) e de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x). Ausência de expressão em carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e em carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X)

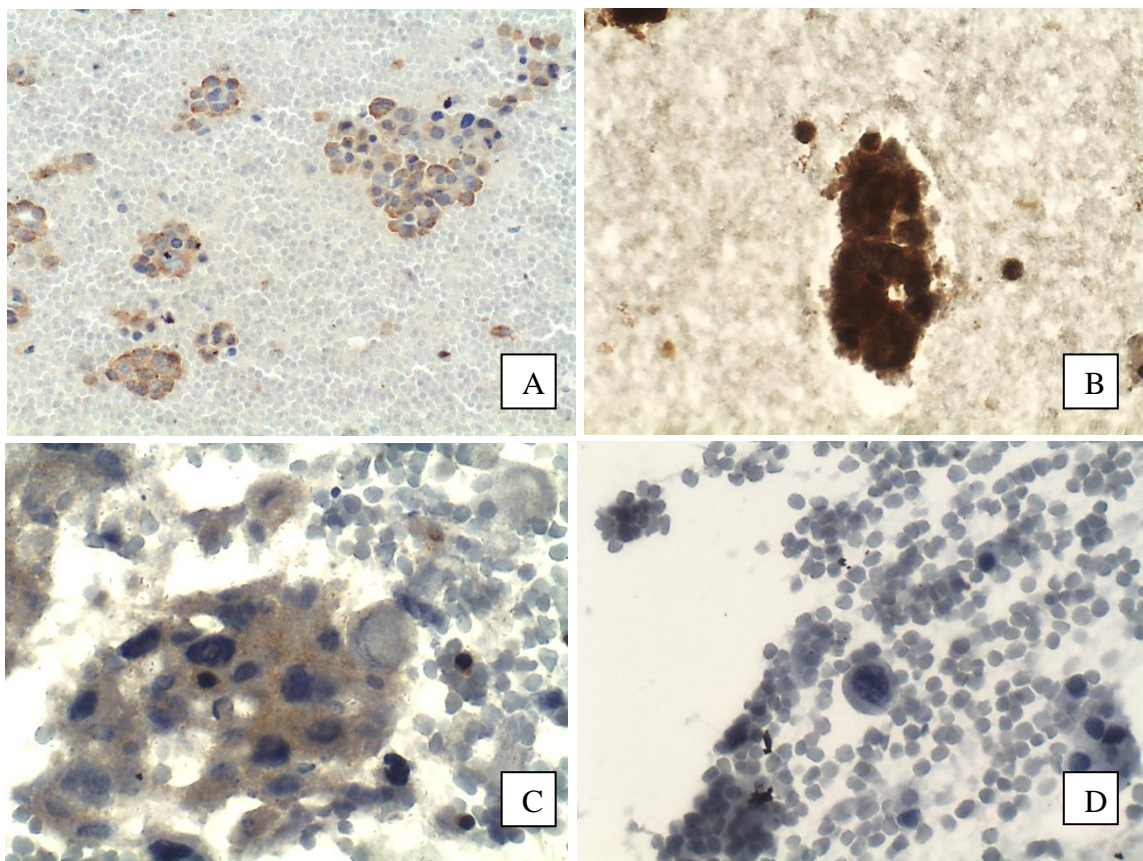
A expressão de p16 foi intensa/moderada e difusa nas amostras de adenocarcinomas, na amostra de carcinoma epidermoide, na amostra de carcinoma de pequenas células e na amostra de carcinoma urotelial. Figura 5.



**Figura 5.** Imunocitoquímica para p16. Expressão em citoplasma e núcleo de células de adenocarcinoma de ovário (A, 200x), de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e de carcinoma urotelial (D, 200X)

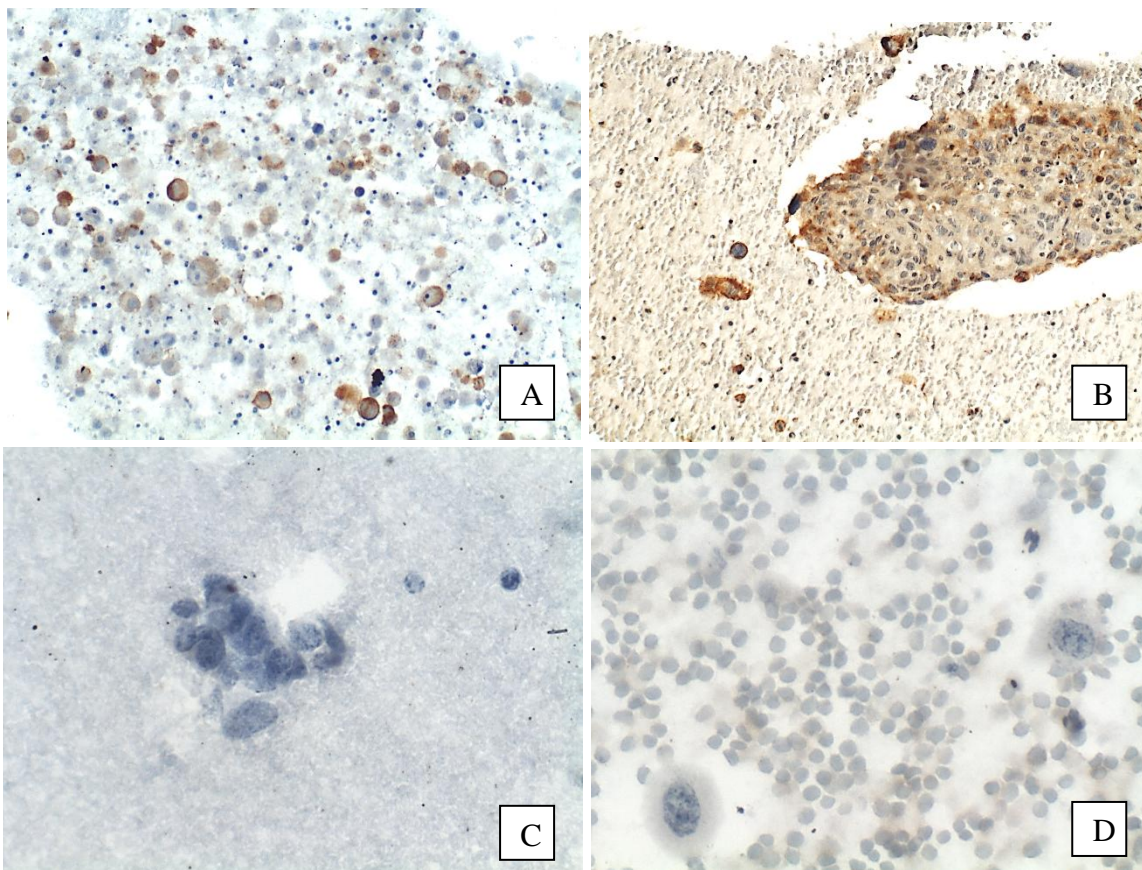


A expressão de IMP3 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e na amostra de carcinoma de pequenas células e moderada na amostra de carcinoma epidermoide. Não houve expressão na amostra de carcinoma urotelial. Figura 6.



**Figura 6** Imunocitoquímica para IMP3. Expressão em citoplasma de células de adenocarcinoma de ovário (A, 200x), de carcinoma de pequenas células de pulmão (B, 400x), de carcinoma epidermoide de colo de útero (C, 100x). Ausência de expressão em carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X)

A expressão de CEA foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e na amostra de carcinoma epidermoide. Não houve expressão na amostra de carcinoma de pequenas células e de carcinoma urotelial. Figura 7.



**Figura 7.** Imunocitoquímica para CEA. Expressão em citoplasma de células de adenocarcinoma de estômago (A, 200x) e de carcinoma epidermoide de colo de útero (B, 100x). Ausência de expressão em carcinoma de pequenas células de pulmão (C, 400x) e em carcinoma urotelial de bexiga (D, 200X)

## 6 DISCUSSÃO

A metástase para cavidades corporais é umas das formas de disseminação do câncer. Os cânceres que mais frequentemente se disseminam para as cavidades são os carcinomas, predominantemente os adenocarcinomas<sup>6,7,8</sup>. A presença do câncer nestas cavidades evolui, frequentemente, com acúmulo de líquido, denominado efusão ou derrame<sup>6,7,8</sup>. Estas efusões são drenadas e os líquidos são encaminhados para estudo citopatológico (citologia oncológica), tendo em vista que a presença de células tumorais nestas cavidades indica um estágio mais avançado da doença e pior prognóstico para o paciente. Da mesma forma, os lavados peritoneais, obtidos durante os procedimentos cirúrgicos para tumores ovarianos, gástricos e endometriais, são encaminhados para pesquisa de células neoplásicas e estadiamento, em conjunto com as peças cirúrgicas<sup>83</sup>.

Os derrames cavitários de causa tumoral podem ser de origem pleural, peritoneal e pericárdica. A maioria das amostras enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica e usadas no presente estudo era de origem pleural e peritoneal, similarmente ao que se observa em estudos prévios.

As metástases para as cavidades são mais freqüentemente originadas de carcinomas primários do pulmão, mama, trato genital feminino e trato gastrointestinal<sup>39,58</sup>. Em concordância com o descrito acima, no presente estudo, os sítios mais frequentes em ordem decrescente foram ovário, mama, pulmão e estômago. A mama foi o sítio primário mais frequente dos carcinomas metastáticos em líquidos pleurais e pericárdicos e, o ovário, dos carcinomas em líquidos ascíticos e lavados peritoneais.

Na maioria dos laboratórios de Anatomia Patológica, as amostras de efusões, que são encaminhadas para estudo citopatológico, são preparadas por citocentrifugação, por ser um método de execução fácil e custo baixo. O “cellblock” é preparado apenas quando as amostras contêm resíduos sólidos, que são colocados em cassete, fixados em formol e submetidos a processamento histológico habitual<sup>7</sup>.

No presente estudo, todas as amostras, com e sem resíduos sólidos, foram preparadas pelo método “cellblock” com a técnica usando plasma-tromboplastina. Através desta técnica, as amostras líquidas se transformam em

coágulos que podem ser submetidos a processamento histológico habitual. Dessa forma, através desta técnica, qualquer amostra e todo o volume da amostra é incluído em parafina e pode ser arquivado e submetido a estudo imunocitoquímico<sup>32</sup>.

Nas efusões tumorais, a celularidade é variável e as atipias celulares podem ser discretas a intensas<sup>6,7,8</sup>. Nas amostras com celularidade elevada e com atipias intensas, as alterações morfológicas permitem ao citopatologista definir a natureza maligna das células<sup>6,7,8</sup>. No entanto, a distinção entre células epiteliais malignas e células mesoteliais reativas ou neoplásicas pode ser um desafio, principalmente em amostras com baixa celularidade e/ou atipias discretas<sup>6,7,8</sup>. Nestes casos, a imunocitoquímica pode auxiliar na identificação da origem das células atípicas.

Com taxas variáveis de sensibilidade e especificidade relatadas na literatura, os marcadores mais utilizados para a identificação de carcinoma em efusões são MOC-31, Claudin-4, Ber-EP4, IMP-3, CEA, B72.3 e CD15 (LeuM1)<sup>37-41</sup>. Nenhum marcador é caracterizado por 100% de especificidade e sensibilidade para identificação do carcinoma em efusões e, dessa forma, mais de um marcador para células epiteliais malignas é, geralmente, usado na rotina diagnóstica para detecção de carcinomas em efusões.

No presente estudo, foram usados os marcadores Claudin-4, MOC-31, Ber-EP4, IMP3 e CEA, por serem os mais frequentemente descritos na literatura. O marcador p16 foi empregado por ser um marcador cuja aplicação na distinção entre carcinoma e células mesoteliais reativas ainda não está bem definida.

B72.3 é um marcador de sensibilidade baixa na detecção de adenocarcinomas do trato genital feminino e pode ser positivo em mesoteliomas. O CD15 apresenta especificidade baixa na detecção de adenocarcinomas por ser expresso em leucócitos, geralmente presentes em líquidos. Além disto, B72.3 e CD15 são marcadores negativos em carcinomas escamosos<sup>84</sup>. Diante disso, estes marcadores foram descartados para o presente estudo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, simultaneamente, a expressão dos marcadores de maior sensibilidade para detecção de carcinoma em líquidos cavitários, considerando o sítio primário e tipo histológico da neoplasia.

O marcador mais sensível para a identificação de adenocarcinoma em líquidos foi o Claudin-4. A expressão de Claudin-4 foi intensa, difusa e na membrana das células dispostas isoladamente ou agrupadas. A positividade foi observada em todos os carcinomas (sensibilidade de 100%) de diferentes sítios primários e tipos histológicos (adenocarcinomas, carcinoma epidermoide, urotelial e neuroendócrino). Estes resultados estão em concordância com os de estudos prévios nos quais este marcador tem sido descrito como o marcador de maior sensibilidade para distinguir adenocarcinomas de células mesoteliais reativas e malignas em citologia de efusões<sup>48-54</sup>.

Além da expressão em células epiteliais malignas, observou-se, no presente estudo, uma marcação citoplasmática fraca para Claudin-4 em macrófagos, os quais poderiam ser confundidos com as células de alguns tipos de adenocarcinomas que se dispõem apenas isoladamente. Além da expressão em macrófagos, outros autores também observaram marcação fraca em algumas amostras de mesoteliomas. Dessa forma, deve-se ressaltar que, além do aspecto morfológico, a análise adequada da intensidade e do padrão de marcação (membrana) deve ser realizada para se evitar resultados falsos positivos.

Algumas amostras de hepatocarcinoma, de adenocarcinoma tipo difuso de estômago, carcinoma de bexiga, rim e adrenal não apresentaram, em estudos prévios, a reatividade para Claudin-4. Dessa forma, na suspeita destes tipos de tumores, o emprego de Claudin-4 não deve ser indicado, isoladamente, para se evitar resultados falsos negativos.

MOC-31 foi o segundo marcador de maior sensibilidade (98%), a expressão deste marcador foi observada em diferentes sítios primários, exceto em uma amostra de colo de útero. Com relação ao tipo histológico dos carcinomas, a expressão de MOC-31 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinoma e na amostra de carcinoma de pequenas células. Na amostra de carcinoma urotelial, a expressão foi moderada e em células esparsas e, na amostra de carcinoma epidermoide, não houve expressão. Em uma meta-análise, os resultados mostraram que a sensibilidade e a especificidade de MOC-31 na distinção entre células malignas e benignas em efusões foram de 0,85 e 0,97, respectivamente<sup>85</sup>. A maioria dos estudos com MOC-31 reportaram uma alta sensibilidade na detecção de adenocarcinomas em



efusões em relação aos outros tipos histológicos. Em um estudo, a sensibilidade para detecção de adenocarcinomas foi de 92.6% e a especificidade de 93%. Em estudo similar, a reatividade positiva entre adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas teve sobreposição (100% vs. 67%, respectivamente,  $p = 0.013$ ). Neste mesmo estudo, houve utilidade no uso desse anticorpo na diferenciação de adenocarcinoma e mesotelioma (100% vs. 35%,  $p < 0.00001$ ). Em uma análise sistemática de 88 trabalhos para estabelecer a sensibilidade e especificidade de 15 marcadores na diferenciação de adenocarcinomas do pulmão e mesotelioma, concluíram que MOC-31 foi o anticorpo mais sensível com 93% de sensibilidade.

A sensibilidade do Ber-Ep4 foi de 80% no total de amostras. Dentre os sítios primários mais frequentes, a maior sensibilidade foi observada para carcinomas de origem ovariana (100%). Com relação ao padrão de expressão e tipo histológico, a expressão de Ber-EP4 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e moderada e difusa na amostra de carcinoma epidermoide. Em concordância com os resultados do presente estudo, em uma meta-análise, a sensibilidade e a especificidade média do Ber-EP4 para detecção de adenocarcinoma em efusões foram de 0,8 e 0,94, respectivamente<sup>62</sup>. Não houve expressão em amostras de carcinoma de pequenas células e de carcinoma urotelial.

A sensibilidade do p16 foi de 71,73% no total de amostras, elevada em carcinomas de sítio primário em ovário e pulmão, mas baixa nos carcinomas de mama. A expressão de p16 foi intensa/moderada e difusa nas amostras de adenocarcinomas, na amostra de carcinoma epidermoide, na amostra de carcinoma de pequenas células e na amostra de carcinoma urotelial. Os autores do presente estudo não encontraram estudos prévios avaliando a expressão de p16 em carcinomas em efusões. A maioria dos estudos sobre p16 em efusões avaliam a expressão em mesoteliomas. Diferentemente de Claudin-4, MOC-31, Ber-EP4 e CEA, a proteína p16 não é um marcador que indica a origem epitelial das células neoplásicas nas efusões. A superexpressão da proteína 16 indica malignidade e por isso sua expressão também é observada em mesoteliomas. Neste sentido, também não foram encontrados estudos avaliando se a expressão deste marcador em carcinoma em efusões indicaria um pior prognóstico.



IMP3 é um marcador de malignidade que pode ser positivo não apenas em carcinomas, mas também em mesoteliomas e linfomas<sup>86-88</sup>. Ikeda et al. estudaram a expressão de IMP3 em um número grande de amostras de efusão para avaliar a utilidade do IMP3 como marcador para distinguir células malignas de mesoteliais reativas. Neste estudo, a imunorreatividade do IMP3 foi observada em 5,1% de células mesoteliais reativas, 36,4% dos casos de mesotelioma maligno, 75,7% dos casos de adenocarcinoma metastático e 100% dos casos de carcinoma de células escamosas. Em nosso estudo, a sensibilidade do IMP3 foi de 62,16% no total de amostras e entre os sítios mais frequentes (ovário, mama e pulmão), a maior sensibilidade foi observada em ovário. A expressão de IMP3 foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e na amostra de carcinoma de pequenas células e moderada na amostra de carcinoma epidermoide. Não houve expressão na amostra de carcinoma urotelial. No estudo de Ikeda et al., ovário também foi o sítio primário de adenocarcinomas com maior positividade.

CEA foi o marcador com menor sensibilidade (45,45%), o que coincide com os resultados de uma meta-análise em que a sensibilidade/especificidade do CEA para o diagnóstico de efusão pleural maligna foi 0,549 / 0,962<sup>79</sup>. A reatividade varia consideravelmente de 21 a 79% dependendo do clone do anticorpo e sítio primário do adenocarcinoma. O anti-CEA policlonal é mais sensível, mas tem a desvantagem de reagir com neutrófilos, macrófagos e provocar reação de fundo dificultando a interpretação<sup>5</sup>. Com relação à expressão de acordo com o sítio primário, no presente estudo, além de não apresentar expressão muito elevada em adenocarcinomas originados em mama e pulmão (sítios frequentes de metástases) apresentou uma expressão muito baixa em adenocarcinomas de origem ovariana. A maior frequência de expressão (80%, 4/5) foi observada em carcinomas de sítio primário no trato gastrointestinal. Em concordância com resultados do presente estudo, em estudos prévios, este marcador detectou a maioria dos adenocarcinomas primário do pulmão, trato gastrointestinal e mama, mas foi frequentemente negativo em adenocarcinomas do ovário. No que diz respeito aos tipos histológicos, a expressão de CEA foi intensa e difusa nas amostras de adenocarcinomas e na amostra de carcinoma epidermoide. Não houve expressão na amostra de carcinoma de pequenas células e de carcinoma

urotelial. Além da expressão em carcinoma, estudos prévios também observaram a expressão deste marcador em cerca de 5 a 10% dos mesoteliomas.

A análise da expressão dos marcadores com relação ao tipo histológico do carcinoma foi prejudicada pelo número escasso de amostras dos tipos histológicos menos frequentemente encontrados em efusões como carcinoma epidermoide, de pequenas células e urotelial. Da mesma forma, há uma escassez de amostras de carcinomas de sítios primários menos freqüentes como endométrio, pâncreas e bexiga.

Nas efusões, células benignas (leucócitos, macrófagos e células mesoteliais) e malignas, de neoplasias menos comuns, como mesoteliomas, linfomas, sarcomas, podem ser encontradas. Diante disso, outra limitação do presente estudo foi falta de análise da especificidade dos marcadores, que apesar de não ser objetivo do presente estudo, complementaria a análise da expressão de cada marcador.

## 7 CONCLUSÃO

Claudin-4 e MOC-31, considerando a elevada sensibilidade e a expressão em carcinomas de diferentes sítios primários e tipos histológicos, são os marcadores mais indicados para a detecção de carcinoma em líquidos. Claudin-4 apresenta vantagem em relação ao MOC-31 por apresentar maior expressão em carcinomas epidermóides.

Ber-EP4, apesar de não apresentar taxa de sensibilidade elevada como a de Claudin-4 e MOC-31, para detecção de carcinomas em efusões, pode ser indicado como opção alternativa, principalmente na suspeita de carcinomas de origem ovariana.

A expressão de p16 é observada na maioria dos carcinomas em efusões, mas em frequência inferior à dos marcadores Claudin-4, MOC-31 e Ber-EP4. Considerando também que sua expressão não descarta neoplasia maligna de origem mesotelial, pode-se concluir que não deve ser usado, de forma isolada, como marcador diagnóstico de carcinoma.

O IMP3 tem menor sensibilidade em comparação com Claudin-4, MOC-31, Ber-EP4 e p16. Em associação a outros marcadores epiteliais, pode ser útil na distinção entre neoplasia maligna e células mesoteliais reativas, entretanto não deve ser utilizado isoladamente, principalmente ao considerar sua positividade para mesotelioma.

Considerando-se a baixa sensibilidade do CEA, pode-se concluir que não deve ser indicado isoladamente para detecção de carcinoma em efusões e lavados peritoneais, principalmente na suspeita de sítio primário em ovário.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 BRASIL1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Estimativa 2018/2019: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2018.

2 Chandra A, Cross P, Denton K, Giles T, Hemming D, Payne C, Wilson A, Wilson P. The BSCC code of practice--exfoliative cytopathology (excluding gynaecological cytopathology). *Cytopathology*. 2009; 20(4):211-23.

3 Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*. 2014; 25(6):356-71.

4 Pereira TC, Saad RS, Liu Y, Silverman JF. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: a pattern recognition approach. *Adv Anat Pathol*. 2006 Jul;13(4):174-84.

5 Fetsch PA, Abati A. Immunocytochemistry in effusion cytology: a contemporary review. *Cancer*. 2001 25;93(5):293-308.

6 Bales CE. Cytological technique, volume 2. In: Koss LG, ed. *Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 2006. p.1590-1592.

7 Naylor B. Pleural, Peritoneal, and Pericardial Effusions, part 2. In: Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company; 3rd ed. 2008. p. 515-77.

8 Shidham VB, Epple J. Appendix 1. Atkinson BF. Collection and processing of effusion fluids. In Shidham, Atkinson BF, ed. *Cytopathologic Diagnosis of Serous Fluids*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company; 1st ed. 2007. p 207-37.

9 Fetsch PA, Simsir A, Brosky K, Abati A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 2002; 26(1):61-6.

10 Gong Y, Sun X, Michael CW, Attal S, Williamson BA, Bedrossian CW. Immunocytochemistry of serous effusion specimens: a comparison of ThinPrep vs cell block. *Diagn Cytopathol.* 2003; 28(1):1-5.

11 Loukeris K, Vazquez MF, Sica G, Wagner P, Yankelevitz DF, Henschke CI, Cham MD, Saqi A. Cytological cell blocks: Predictors of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma subtypes. *Diagn Cytopathol.* 2012;40(5):380-7.

12 Shivakumarswamy U, Arakeri SU, Karigowdar MH, Yelikar B. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *J Cytol.* 2012 Jan;29(1):11-5.

13 Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *Am J Clin Pathol.* 2000 ; 114(4):599-606.

14 Noda Y, Fujita N, Kobayashi G et al. Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol* 2010;45:868–75.

15 Collins GR, Thomas J, Joshi N, Zhang S. The diagnostic value of cell block as an adjunct to liquid-based cytology of bronchial washing specimens in the diagnosis and subclassification of pulmonary neoplasms. *Cancer Cytopathol.* 2012 Apr 25;120(2):134-41.

16 Kerstens HM, Robben JC, Poddighe PJ, Melchers WJ, Boonstra H, de Wilde PC, Macville MV, Hanselaar AG. AgarCyto: a novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(5):709-18.

17 Choi SJ, Choi YI, Kim L, Park IS, Han JY, Kim JM, Chu YC. Preparation of compact agarose cell blocks from the residues of liquid-based cytology samples. *Korean J Pathol*. 2014;48(5):351-60.

18 Mansy SS, Abbas MA, Yehia HA, Abdelrazik SM, Ghanem LY, Amin TM. Value of the innovated technique agarose cell block in improving the sensitivity of urine cytology in cases of bladder carcinoma. *Ultrastruct Pathol*. 2006;30(5):379-85.

19 Mansy SS. Agarose cell block: innovated technique for the processing of urine cytology for electron microscopy examination. *Ultrastruct Pathol*. 2004;28(1):15-21.

20 Fahey C, Bedrosian UK. Collodion bag: a cell block technique for enhanced cell collection. *Lab Med* 1993;74:94–6.

21 He QL, Zhu YZ, Zheng GJ et al. A new convenient technique for making cell blocks. *Cell Tissue Res* 2012;350:395–400.

22 Mayall FG. An FNA cytology foam core device for making cell blocks. *J Clin Pathol* 2012;65:959–61.

23 Wen CH, Tsao SC, Su YC, Wu CC, Chai CY. Utility of the capsule-based technique for cell block preparation – in body fluids and Liqui-PREPTM specimens. *Acta Cytol* 2011;55:460–6.

24 Yung RC, Otell S, Illei P et al. Improvement of cellularity on cell block preparations using the so-called tissue coagulum clot method during endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol* 2012;120:185–95.

25 Wagner DG, Russell DK, Benson JM et al. Cellient™ automated cell block versus traditional cell block preparation: a comparison of morphologic features and immunohistochemical staining. *Diagn Cytopathol* 2011;39:730–6.

26 van Hemel BM, Suurmeijer AJ. Effective application of the methanol-based PreservCyt(TM) fixative and the Cellient(TM) automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry, and molecular biology. *Diagn Cytopathol* 2013;41: 734–41.

27 Gorman BK, Kosarac O, Chakraborty S, Schwartz MR, Mody DR. Comparison of breast carcinoma prognostic/predictive biomarkers on cell blocks obtained by various methods: Cellient, formalin and thrombin. *Acta Cytol* 2012;56:289–96.

28 Prendeville S, Brosna T, Browne TJ, McCarthy J. Automated Cellient™ cytoblocks: better, stronger, faster? *Cytopathology* 2014;25:372–80.

29 Kruger AM, Stevens MW, Kerley KJ, Carter CD. Comparison of the Cellient(™) automated cell block system and agar cell block method. *Cytopathology*. 2014;25(6):381-8.

30 Montgomery E, Gao C, de Luca J, Bower J, Attwood K, Ylagan L. Validation of 31 of the most commonly used immunohistochemical antibodies in cytology prepared using the Cellient(®) automated cell block system. *Diagn Cytopathol*. 2014;42(12):1024-33.

31 Wagner DG, Russell DK, Benson JM et al. Cellient™ automated cell block versus traditional cell block preparation: a comparison of morphologic features and immunohistochemical staining. *Diagn Cytopathol* 2011;39:730–6.

32 Castro, TMML ; Carneiro, MV ; Ferreira, VMM ; Motoyama, AB ; Carneiro, FP. Aplicação do Método -Plasma-Tromboplastina/ Trombina- no Preparo de Amostras Citológicas para Pesquisa de Câncer no Laboratório de Anatomia Patológica Revista Brasileira Ciências da Saúde, v. 20, p. 85-90, 2016.

33 Nigro K, Tynski Z, Wasman J, Abdul-Karim F, Wang N. Comparison of cell block preparation methods for nongynecologic ThinPrep specimens. *Diagn Cytopathol.* 2007;35(10):640-3.

34 Jing X, Li QK, Bedrossian U, Michael CW. Morphologic and immunocytochemical performances of effusion cell blocks prepared using 3 different methods. *Am J Clin Pathol.* 2013 ;139(2):177-82.

35 Kulkarni MB, Desai SB, Ajit D, Chinoy RF. Utility of the thromboplastin-plasma cell-block technique for fine-needle aspiration and serous effusions. *Diagn Cytopathol.* 2009; 37(2):86-90.

36 Keyhani-Rofagha S, Vesey-Shecket M. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer.* 2002 25;96(4):204-9.

37 Grefte JM, de Wilde PC, Salet-van de Pol MR, Tomassen M, Raaymakers-van Geloof WL, Bulten J. Improved identification of malignant cells in serous effusions using a small, robust panel of antibodies on paraffin-embedded cell suspensions. *Acta Cytol.* 2008;52(1):35-44.

38 Lyons-Boudreaux V, Mody DR, Zhai J, Coffey D. Cytologic malignancy versus benignancy: how useful are the "newer" markers in body fluid cytology? *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(1):23-8.

39 Saleh HA, El-Fakharany M, Makki H, Kadhim A, Masood S. Differentiating reactive mesothelial cells from metastatic adenocarcinoma in serous effusions:



the utility of immunocytochemical panel in the differential diagnosis. *Diagn Cytopathol.* 2009;37(5):324-32.

40 Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Kitamura T, Mitsuya T. IMP3/L523S, a novel immunocytochemical marker that distinguishes benign and malignant cells: the expression profiles of IMP3/L523S in effusion cytology. *Hum Pathol.* 2010;41(5):745-50.

41 Yahya ZM, Ali HH, Hussein HG. Evaluation of the sensitivity and specificity of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of effusion cytology. *Oman Med J.* 2013;28(6):410-6.

42 El Hag MI, Ha J, Farag R, El Hag AM, Michael CW. Utility of GATA-3 in the work-Up of breast adenocarcinoma and its differential diagnosis in serous effusions: A Cell-Block Microarray Study. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(9):731-6.

43 El Hag M, Schmidt L, Roh M, Michael CW. Utility of TTF-1 and Napsin-A in the work-up of malignant effusions. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(4):299-304.

44 Saad RS, Ghorab Z, Khalifa MA, Xu M. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. *World J Gastrointest Surg.* 2011 27;3(11):159-66.

45 Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol.* 2009;10:235.

46 Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:511-516.

47 Morin PJ (2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65:9603–9606.

48 Afshar-Moghaddam N, Heidarpour M, Dashti S. Diagnostic value of claudin-4 marker in pleural and peritoneal effusion cytology: Does it differentiate

between metastatic adenocarcinoma and reactive mesothelial cells? *Adv Biomed Res.* 2014 18;3:161.

49 Kim NI, Kim GE, Lee JS. Diagnostic Usefulness of Claudin-3 and Claudin-4 for Immunocytochemical Differentiation between Metastatic Adenocarcinoma Cells and Reactive Mesothelial Cells in Effusion Cell Blocks. *Acta Cytol.* 2016;60(3):232-9.

50 Oda T, Ogata S, Kawaguchi S, Minabe S, Dokyu M, Takahashi H, Kumazawa F, Shimazaki H, Takano M, Hase K, Ozeki Y, Kanoh S, Nakanishi K. Immunocytochemical utility of claudin-4 versus those of Ber-EP4 and MOC-31 in effusion cytology. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(6):499-504.

51 Jo VY, Cibas ES, Pinkus GS. Claudin-4 immunohistochemistry is highly effective in distinguishing adenocarcinoma from malignant mesothelioma in effusion cytology. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(4):299-306.

52 Lonardi S, Manera C, Marucci R, Santoro A, Lorenzi L, Facchetti F. Usefulness of Claudin 4 in the cytological diagnosis of serosal effusions. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(5):313-7.

53 Mohamed F, Vincent N, Cottier M, Peoc'h M, Merrouche Y, Patouillard B, Paul S, Genin C. Improvement of malignant serous effusions diagnosis by quantitative analysis of molecular claudin 4 expression. *Biomarkers.* 2010;15(4):315-24.

54 Facchetti F, Lonardi S, Gentili F, Bercich L, Falchetti M, Tardanico R, Baronchelli C, Lucini L, Santin A, Murer B. Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. *Virchows Arch.* 2007;451(3):669-80.

55 Willuda J, Honegger A, Waibel R, et al. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: Engineering of a humanized anti-

epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* 1999;59:5758–5767.

56 Patil B, Shivkumar V, Gangane N. Utility of MOC-31 monoclonal antibody in differentiating metastatic adenocarcinoma cells and reactive mesothelial cells in effusion cytology. *Indian J Pathol Microbiol*. 2018;61(1):90-93.

57 Politi E, Kandaraki C, Apostolopoulou C, Kyritsi T, Koutselini H. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. *Diagn Cytopathol* 2005;32:151–155.

58 Kundu UR, Krishnamurthy S. Use of the monoclonal antibody MOC-31 as an immunomarker for detecting metastatic adenocarcinoma in effusion cytology. *Cancer Cytopathol* 2011;119:272–278.

59 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* 2007;36:20–25.

60 Yaziji H, Battifora H, Barry TS, Hwang HC, Bacchi CE, McIntosh MW, Kussick SJ, Gown AM. Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Mod Pathol*. 2006 Apr;19(4):514-23.

61 Lyons-Boudreaux V, Mody DR, Zhai J, Coffey D. Cytologic malignancy versus benignancy: how useful are the "newer" markers in body fluid cytology? *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Jan;132(1):23-8.

62 Wang B, Li D, Ou X, Yi Q, Feng Y. Diagnostic accuracy of Ber-EP4 for metastatic adenocarcinoma in serous effusions: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 17;9(9):e107741.

63 Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1262–1270.

64 Bell JL, Wächter K, Mühleck B, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci.* 2013; 70(15):2657-75.

65 Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2008; 21(4):431-7.

66 Hu S, Wu X, Zhou B, Xu Z, Qin J, Lu H, Lv L, Gao Y, Deng L, Yin J, Li G. IMP3 combined with CD44s, a novel predictor for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140(6):883-93.

67 Lin L, Zhang J, Wang Y, Ju W, Ma Y, Li L, Chen L. Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3 predicts a poor prognosis for colorectal adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2013; 6(3):740-744.

68 Xylinas E, Cha EK, Khani F, Kluth LA, Rieken M, Volkmer BG, Hautmann R, Küfer R, Chen YT, Zerbib M, Rubin MA, Scherr DS, Shariat SF, Robinson BD. Association of oncofetal protein expression with clinical outcomes in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol.* 2014;191(3):830-41.

69 Beljan Perak R, Durdov MG, Capkun V, Ivcevic V, Pavlovic A, Soljic V, Peric M. IMP3 can predict aggressive behaviour of lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol.* 2012;7:165.

70 Clauditz TS, Wang CJ, Gontarewicz A, Blessmann M, Tennstedt P, Borgmann K, Tribius S, Sauter G, Dalchow C, Knecht R, Münscher A, Wilczak W. Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(2):125-32.

71 Li S, Cha J, Kim J, Kim KY, Kim HJ, Nam W, Cha IH. Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3: a novel prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011;33(3):368-74.

72 Schaeffer DF, Owen DR, Lim HJ, Buczkowski AK, Chung SW, Scudamore CH, Huntsman DG, Ng SS, Owen DA. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival. *BMC Cancer.* 2010;10: 59.

73 Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Liu Q, Balaji KC, Rock KL, Wu CL. Combination of quantitative IMP3 and tumor stage: a new system to predict metastasis for patients with localized renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008;14(17):5579-84.

74 Dinu M, Ciurea RN, Stefan M, Georgescu AC. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of neoplastic pleural effusions. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(3 Suppl):817-20.

75 Su XY, Li GD, Liu WP, Xie B, Jiang YH. Cytological differential diagnosis among adenocarcinoma, epithelial mesothelioma, and reactive mesothelial cells in serous effusions by immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(12):900-8.

76 Murugan P, Siddaraju N, Habeebullah S, Basu D. Immunohistochemical distinction between mesothelial and adenocarcinoma cells in serous effusions: a combination panel-based approach with a brief review of the literature. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52(2):175-81.

77 Wu GP, Zhang SS, Fang CQ, Liu SL, Wang EH. Immunocytochemical panel for distinguishing carcinoma cells from reactive mesothelial cells in pleural effusions. *Cytopathology*. 2008;19(4):212-7.

78 Ueda J, Iwata T, Ono M, Takahashi M. Comparison of three cytologic preparation methods and immunocytochemistries to distinguish adenocarcinoma cells from reactive mesothelial cells in serous effusion. *Diagn Cytopathol*. 2006;34(1):6-10.

79 Shi HZ, Liang QL, Jiang J, Qin XJ, Yang HB. Diagnostic value of carcinoembryonic antigen in malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Respirology*. 2008 Jun;13(4):518-27.

80 Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16(3):205-42.

81 Hida T, Matsumoto S, Hamasaki M, Kawahara K, Tsujimura T, Hiroshima K, Kamei T, Taguchi K, Iwasaki A, Oda Y, Honda H, Nabeshima K. Deletion status of p16 in effusion smear preparation correlates with that of underlying malignant pleural mesothelioma tissue. *Cancer Sci*. 2015;106(11):1635-41.

82 Hwang HC, Sheffield BS, Rodriguez S, Thompson K, Tse CH, Gown AM, Churg A. Utility of BAP1 Immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma in Effusion Cytology Specimens. *Am J Surg Pathol*. 2016 ;40(1):120-6.

83 X Lin O. Challenges in the interpretation of peritoneal cytologic specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(5):739-42.

84 Ordonez NG (2006) The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study. *Mod Pathol* 19:417–428

85 Li D, Wang B, Hu Q, Shen Y, Xu D, Wang T, Wen F. Diagnostic accuracy of MOC-31 for malignant effusions: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(6):6003-9.

86 Hanley KZ, Facik MS, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Bonfiglio TA, Xu H. Utility of anti-L523S antibody in the diagnosis of benign and malignant serous effusions. *Cancer.* 2008;114(1):49-56.

87 Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Kitamura T, Mitsuya T. IMP3/L523S, a novel immunocytochemical marker that distinguishes benign and malignant cells: the expression profiles of IMP3/L523S in effusion cytology. *Hum Pathol.* 2010;41(5):745-50.

88 Yan J, Wei Q, Jian W, Liu J, Tang H, Ge J, Zhou J, Zhao T. A fine decision tree consisted of CK5/6, IMP3 and TTF1 for cytological diagnosis among reactive mesothelial cells, metastatic adenocarcinoma of lung and non-lung origin in pleural effusion. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014,15;7(9):5810-8.