



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**PAINEL INICIAL DE MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS PARA
IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS PRIMÁRIOS DE CARCINOMAS EM EFUSÕES E
LAVADOS PERITONEAIS EM MULHERES.**

Gustavo Henrique Soares Takano

Brasília- DF
2021

**PAINEL INICIAL DE MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS PARA
IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS PRIMÁRIOS DE CARCINOMAS EM EFUSÕES E
LAVADOS PERITONEAIS EM MULHERES.**

Tese apresentada ao programa Pós-
Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de
Brasília para a obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas

Orientadora: Profa. Dra Fabiana Pirani Carneiro

Brasília- DF

2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

TT136p Takano, Gustavo Henrique Soares
Painel inicial de marcadores imunocitoquímicos para
identificação de sítios primários de carcinomas em efusões e
lavados peritoneais em mulheres / Gustavo Henrique Soares
Takano; orientador Fabiana Pirani Carneiro. -- Brasília,
2021.
110 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Citopatologia. 2. marcadores imunocitoquímicos. 3.
carcinoma. 4. efusões. 5. lavado peritoneal. I. Carneiro,
Fabiana Pirani, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Gustavo Henrique Soares Takano

**PAINEL INICIAL DE MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS PARA
IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS PRIMÁRIOS DE CARCINOMAS EM EFUSÕES E
LAVADOS PERITONEAIS EM MULHERES.**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
(Presidente)
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dra. Leonora Maciel de Souza Vianna
Universidade de Brasília

Profª. Drª. Larissa Cardoso Marinho
Pontifícia Universidade Católica de Goiás –
PUC-GO

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães
Universidade de Brasília

Profª. Drª. Lianna Martha Soares Mendes
Universidade Federal do Piauí – UFPI

*Dedico este trabalho aos meus filhos
Gabriel e Beatriz.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro, pelo ato de coragem e fé para comigo. Nos trechos mais íngremes deste deserto científico em que caminhamos juntos, as pegadas são apenas dela.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pelo companheirismo laboral e pelo exemplo de honradez, inspirando a mim e a dezenas de outros pesquisadores.

A Prof. Msc. Tércia Maria Mendes Lousa de Castro, pelo auxílio e primor técnico na manufatura das reações e lâminas utilizadas neste laboratório.

A equipe da Unidade de Anatomia Patológica, pelo apreço não só às obrigações assistenciais, mas também a missão de fomentar o ensino e a pesquisa em Ciências Médicas.

“Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por estranho que pareça, sou grato a esses professores. ...
... A sabedoria é a única riqueza que os tiranos não podem expropriar.”

Kalil Gibran

RESUMO

Takano, Gustavo Henrique Soares. Painel inicial de marcadores imunocitoquímicos para identificação de sítios primários de carcinomas em efusões e lavados peritoneais em mulheres [Tese]. 2020. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília.

Introdução. A análise citológica de efusões cavitárias e lavado peritoneal é parte da rotina laboratorial em Anatomia patológica sendo procedimento de baixo risco para o paciente e de baixo custo hospitalar. A maior parte das efusões malignas é encontrada em mulheres porque a mama e o ovário estão entre os locais que mais frequentemente evoluem com metástase para cavidades corporais (pleural, peritoneal e pericárdico). Não é possível identificar o sítio primário dos carcinomas em efusões/lavado peritoneal apenas por análise citomorfológica, e, portanto, a imunocitoquímica é utilizada como método complementar. Não existem marcadores imunocitoquímicos com 100% de sensibilidade e especificidade para identificação de sítios primários de carcinoma. TTF-1 para pulmão, GATA-3 para mama e PAX-8 para ovário são comumente usados para este fim. O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade e especificidade de um painel incluindo esses marcadores para a detecção de sítio primário de carcinomas em efusões/lavado peritoneal. **Métodos.** Amostras de efusões de líquidos pleural, pericárdico e peritoneal, e de lavado peritoneal, com carcinoma de sítio primário conhecido, foram preparadas usando o método “*cell block*”, seguido por imunocitoquímica. Inicialmente as amostras foram triadas com MOC-31 e Claudina-4 para confirmar o diagnóstico de carcinoma. Nas amostras com carcinoma, avaliou-se a expressão de marcadores de sítio primário TTF-1, PAX-8 e GATA-3, do painel inicial sugerido, que foi complementado pelos marcadores HBME e RE. **Resultados.** Entre as mulheres, o sítio primário mais frequente de carcinoma metastático para derrame pleural e pericárdico foi a mama, seguido pelo pulmão; e para derrame e lavado peritoneal foi o ovário, seguido pelo trato gastrointestinal (estômago ou cólon). Os perfis esperados para carcinomas dos sítios primários mais comuns - mama (GATA-3 (+), PAX-8 (-), TTF-1 (-)), ovário (PAX-8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (-)), pulmão (TTF-1 (+), PAX-8 (-) GATA-3 (-)) e trato gastrointestinal (PAX-8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-)) foram observados em 88,23% (45/51) das amostras de mulheres com carcinoma destes sítios primários. Usando TTF-1 como único marcador de sítio primário, 6,25% dos carcinomas com sítio primário diferente de pulmão teriam sido diagnosticados erroneamente como sítio primário

de pulmão. Os marcadores HBME e RE, em situações específicas, mostraram-se de valia para confirmação diagnóstica. Baseando-se nestes resultados, foi proposto, além de um painel inicial, um algoritmo com os marcadores indicados para fins de definição de sítio primário de carcinoma em efusões e lavado peritoneal. **Conclusão:** O painel inicial de marcadores incluindo GATA-3, PAX-8 e TTF-1 permite, com alta sensibilidade e especificidade, a identificação dos sítios primários mais prováveis e exclusão de outros sítios primários mais frequentes de carcinomas em efusões de mulheres. Os resultados destacam a importância de usar um painel de marcadores para evitar erros de identificação.

Palavras-chave: citologia, imunocitoquímica, efusões, lavado peritoneal, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, carcinoma, TTF-1, GATA-3, PAX8, RE, HBME

ABSTRACT

Takano, Gustavo Henrique Soares. Initial panel of immunocytochemical markers for metastatic carcinoma in women's effusions and peritoneal washing [Thesis]. 2021. Faculty of Medicine. University of Brasilia.

Introduction. Body cavity fluids and peritoneal washings are anatomical pathology routine tests. Most malignant effusions are found in women because breast and ovary are among metastatic carcinoma original sites to body cavity fluids (pleural, peritoneal e pericardial). When carcinoma is diagnosed in effusions, it is not possible to identify its site of origin by cytomorphology only and, therefore, immunocytochemistry is used as a complementary method. No immunocytochemical markers get 100% sensitivity and specificity for carcinoma primary site identification. Markers most used are TTF-1 for lung, GATA-3 for breast and PAX-8 for ovary. The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of a panel including these markers for detecting primary site of carcinomas in effusions. **Methods.** Effusions samples (pleural, pericardial, and peritoneal) and peritoneal washing with known primary site carcinomas were prepared using cell block method and immunocytochemistry. Preceded by screening with MOC-31 and Claudin-4, tests for evaluate the expression of primary site markers (TTF-1, PAX8 and GATA-3) and comparative markers (HBME and ER) were performed. **Results.** Among women, the most frequent primary site of metastatic carcinoma to both pleural and pericardial effusion was breast, followed by lung; and to peritoneal effusion and washing was ovary, followed by gastrointestinal tract (stomach or intestine). The expected profile for carcinomas of the most common primary sites, breast (GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (-)), ovary (PAX-8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (-)), lung (TTF-1 (+), PAX-8 (-) GATA-3 (-)) and gastrointestinal tract (PAX-8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-)) was observed in 88.23% (45/51) of women samples with carcinoma of these primary sites. By using TTF-1 as sole primary site marker, 6,25% of carcinomas with primary site other than lung would have been misdiagnosed as primary site of lung. HBME and RE markers, in specific situations, proved to be valuable for diagnostic confirmation. Based on these results, in addition to the initial profile, an algorithm for carrying out the tested markers in this study for carcinoma diagnostic in effusions and peritoneal washing was proposed. **Conclusion:** The initial panel of markers including GATA-3, PAX-8 and TTF-1 allows, with high sensitivity and specificity, the identification of the probable and exclusion of the other most frequent primary sites of carcinomas in effusions

of women. The results highlight the importance a markers panel usage to avoid misidentification of metastatic carcinomas primary sites in effusions.

Keywords: cytology, immunocytochemistry, effusion, peritoneal washing, pleural, pericardial, peritoneal, carcinoma, TTF-1, GATA-3, PAX8, RE, HBME.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exame citopatológico de Carcinoma anaplásico da tireoide, coloração Papanicolaou, 200x. Hospital Universitário de Brasília..... 21
- Figura 2:** Blocos celulares sob técnica de plasma-tromboplastina. Laboratório de Patologia da FM, UnB..... 23
- Figura 3.** Ilustração esquemática da reação imuno-histoquímica descrita por STERNBERG et al, 1970. 24
- Figura 4:** Imuno-histoquímica para RE em carcinoma mamário, 400x. Hospital Universitário de Brasília. 24
- Figura 5.** Estrutura esquemática da proteína GATA-3 e detalhe da sua codificação no gene GATA3. (CHEN *et al.*, 2012)..... 27
- Figura 6:** A e B, imunocitoquímica em cell block, 400 X. Expressão de GATA-3 em amostras de líquido pleural (A) e líquido pericárdico (B). C, imuno-histoquímica para GATA-3 em amostra de biópsia de pericárdio com carcinoma de sítio primário em mama. A, B e C (escore 5+3=8), (100X) 47
- Figura 7:** Imunocitoquímica em cell block, 400 X. Marcação citoplasmática inespecífica de GATA3 em amostra com carcinoma de sítio primário em cólon (A) e em células mesoteliais de amostras benignas de efusão (B). 48
- Figura 8:** A e B (400X), imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de RE em amostras de líquido pleural com carcinoma de sítio primário em mama. Em A, escore 2+3=5; em B, escore 3+2=5. C, imuno-histoquímica para RE em produto de mastectomia da mama., escore 4+3=7, 200X..... 49
- Figura 9:** Imunocitoquímica em cell block, 400 X. Expressão de RE em amostra de lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário, escore 4+2=6. 50
- Figura 10:** Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de RE em amostras de líquido pericárdico (A) e líquido ascítico (B), respectivamente com carcinoma de sítio primário em colo do útero e em peritônio. Em A e B, escore 4+3=7. 51
- Figura 11:** Imunocitoquímica em *cell block*, A e B (400 X). Expressão de PAX8 em amostras de efusão/lavado com carcinoma de sítio primário em ovário, A (escore 5+3=8) e B (escore 5+2=7). C, expressão de PAX8 em amostra de produto de ooforectomia, escore 5+3, 200X. 52
- Figura 12:** Imunocitoquímica em cell block, 400 X. Expressão de PAX8 em amostra com carcinoma primário de peritônio(A), colo de útero (B) e rim (C). Escores: A, 5+3=8; B, 3+3=6; e C, 5+3=8..... 52
- Figura 13:** A e B, imunocitoquímica em *cell block*, 200X(A) e 400X(B). Expressão de HBME em amostras de líquido ascítico (A) e lavado peritoneal (B), ambas com carcinoma de sítio primário em ovário, A (escore 3+3=6) e B (escore 4+3=7). C, imuno-histoquímica para HBME em produto de ooforectomia com carcinoma de ovário, escore 4+3=7..... 53
- Figura 14:** Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de HBME em amostras de líquido pleural (A) e ascítico (B), respectivamente com carcinoma de sítio primário em pulmão (escore 4+3=7) e em peritônio (escore 4+3=7) e em células mesoteliais (C) de lavado peritoneal de pacientes com cistadenoma (C, escore 4+3=7)..... 54
- Figura 15:** Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de TTF-1 em amostra de

líquido pericárdico com carcinoma de sítio primário em mama (A) e em amostra de líquido pleural com sítio primário em estômago (B).....	55
Figura 16: Mediana do escore total de expressão de GATA-3 e RE em carcinomas metastáticos de mama.....	58
Figura 17. Mediana do escore total de expressão de RE, PAX8 e HBME em carcinomas metastáticos de ovário em efusões/lavado peritoneal.....	62
Figura 18. Algoritmo inicial para marcadores imunocitoquímicos de efusões e lavado peritoneal em mulheres.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica.....	42
Tabela 2. Sítios primários dos carcinomas metastáticos em efusões e lavado peritoneal	45
Tabela 3. Diagnósticos dos pacientes com efusões e lavados peritonias benignos.....	46
Tabela 4: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de GATA-3 em amostras de efusão com carcinomas de sítio primário em mama.....	47
Tabela 5: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de RE em amostras de efusão com carcinomas de sítio primário em mama.....	49
Tabela 6: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de RE em amostras de efusão/lavado com carcinomas de sítio primário em ovário.	50
Tabela 7: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de PAX8 em amostras de efusão/lavado com carcinomas de sítio primário em ovário	51
Tabela 8: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de HBME em amostras com carcinomas de sítio primário em ovário metastáticos em efusões.....	53
Tabela 9: Frequência de expressão de GATA-3 em carcinoma metastático para efusões e em células de efusões benignas.	56
Tabela 10: Frequência de expressão de RE em carcinoma metastático para efusões e em células de efusões benignas	57
Tabela 11: Sensibilidade e especificidade dos marcadores RE e GATA-3 para detecção de carcinoma de mama metastáticos em efusões:	57
Tabela 12: Frequência de expressão de RE em carcinoma metastático para efusões e em células de efusões benignas.	59
Tabela 13: Frequência de expressão de PAX8 em carcinoma metastático para efusões e em células de efusões benignas.	60
Tabela 14: Frequência de expressão de HBME em carcinoma metastático para efusões e em células de efusões benignas	61
Tabela 15: Sensibilidade, especificidade e acurácia dos marcadores RE, PAX8 e HBME para detecção de carcinoma de ovário metastáticos em efusões e lavados:	61
Tabela 16: Perfil de marcadores por sítio primário.	63

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

± dp	Desvio padrão.
°C	Graus Celsius.
100X	aumento óptico de 100 vezes.
200X	aumento óptico de 200 vezes.
400X	aumento óptico de 400 vezes.
ANOVA	do inglês <i>Analysis of variance</i> ; análise de variância.
Ca	Carcinoma
CACON	de Centro de Alta Complexidade em Oncologia
CDX-2	do inglês <i>Caudal-type homeobox transcription factor 2</i> , fator transcricional 2 do tipo caudal do <i>homeobox</i> .
CK20	do inglês <i>Cytokeratin 20</i> , citoceratina 20.
CK5/6	do inglês <i>Cytokeratin 5/6</i> , citoceratina 5/6.
DAB	3-4, diaminobenzidina
DNA	do inglês D eoxyribonucleic A cid, ácido desoxirribonucleico.
EGFR	do inglês <i>Epithelial Growth Factor Receptor</i> , receptor para o fator de crescimento epitelial.
EpCAM	do inglês <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> ; molécula de adesão de célula epitelial
FM	Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.
GATA	da sequência do DNA [A/T] GATA [A/G]
GATA3	gene codificador da proteína GATA3.
GATA-3	do inglês <i>GATA binding protein 3</i> ; proteína ligante 3 do GATA.
HER2	sigla do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> ; receptor 2 do fator de crescimento epitelial humano.
HE	Hematoxilina e eosina
HBME	do inglês <i>Hector Battifora Mesothelial cell</i> ; célula mesotelial de Hector Battifora
HBME-1	do inglês <i>Hector Battifora Mesothelial cell 1</i> ; célula mesotelial de Hector Battifora 1, refere-se ao clone deste antígeno.
HUB	H ospital U niversitário de B rasília

INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Litro
LSAB	do inglês, <i>Labelled Streptavidin Biotin</i> ; estreptavidina biotina rotulada
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
min	minutos
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
MOC-31	nome codificado para um clone do EpCam.
mRNA	RNA mensageiro
PAP	P eroxidase ant iperoxidase
PAX2	do inglês <i>Paired-box gene 2</i> , gene 2 de <i>paired-box</i> .
PAX8	do inglês <i>Paired-box gene 8</i> , gene 8 de <i>paired-box</i> .
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> ; solução fosfato salina
PCR	do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
PSOGI	do inglês <i>Peritoneal Surface Oncology Group International</i> , Grupo Internacional de Oncologia da superfície peritoneal.
pH	p otencial H idrogeniônico
RE	R eceptor de E strógeno
RP	R eceptor de P rogesterona
rpm	r otação p or m inuto
SALL4	do inglês <i>Sal-like protein 4</i> , proteína 4 do tipo sal.
SOX2	do inglês <i>Sex determining region Y-box 2</i> , região 2 determinante do sexo <i>Y-box</i> .
SUS	Sistema Único de Saúde.
SPT24	Código de um dos clones do TTF-1 citados.
TBS	do inglês, <i>Tris-Buffered Saline</i> ; Tampão salino Tris
Teste t	Teste de distribuição t de Student.
TTF-1	do inglês, <i>Thyroid Transcription Factor 1</i> , fator de transcrição tireoidiano 1
UnB	U niversidade de B rasília
WT-1	do inglês W ilms T umor protein 1, proteína 1 do tumor de Wilms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Efusões malignas e o papel da citopatologia	17
1.2. Saúde da mulher, câncer e efusões	20
1.3. A técnica citopatológica.....	21
1.4. Imuno-histoquímica e Imunocitoquímica	23
1.5. Dos marcadores imunocitoquímicos.....	26
1.5.1. GATA-3.....	27
1.5.2. PAX8	29
1.5.3. TTF-1.....	30
1.5.4. RE.....	31
1.5.5. HBME.....	33
1.5.6. MOC-31 e Claudina-4	34
1.5.7. Calretinina.	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Amostras.....	39
4.1.1. Critérios de Exclusão.....	39
4.2. Preparo do <i>cell block</i> pelo método plasma-tromboplastina.....	39
4.3. Coloração com hematoxilina e eosina (HE)	40
4.4. Imunocitoquímica.....	40
4.5. Análise estatística	43
4.6. Delineamento experimental.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Tipo, frequência e diagnóstico das amostras de efusões e lavado peritoneal.....	45
5.2. Análise da expressão de GATA-3	46
5.2.1 Expressão de GATA-3 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em mama	46
5.2.2 Expressão de GATA-3 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário, com carcinoma de outros sítios primários e em amostras benignas de efusões e lavados peritoneais.....	47
5.3 Análise da expressão de RE.....	48
5.3.1 Expressão de RE em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em mama.....	48

5.3.2	Expressão de RE em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário.	49
5.3.3	Expressão de RE em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de outros sítios primários e em amostras benignas de efusões e lavados peritoneais	50
5.4.	Análise da expressão de PAX8.....	51
5.4.1.	Expressão de PAX8 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário	51
5.4.2	Expressão de PAX8 em carcinoma de mama e de outros sítios primários metastático em efusões e em efusões benignas	52
5.5.	Análise da expressão de HBME.	53
5.5.1.	Expressão de HBME em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário	53
5.5.2	Expressão de HBME em carcinoma de mama e de outros sítios primários metastático em efusões e em efusões benignas	54
5.6.	Análise da expressão de TTF-1	54
5.6.1.	Expressão de TTF-1 em carcinoma de sítio primário em mama, ovário e de outros sítios em efusões e em efusões benignas	54
5.7.	Sensibilidade e especificidade dos marcadores re e gata-3 para detecção de carcinoma de sítio primário de mama em efusões e lavado peritoneal.....	55
5.8.	Sensibilidade e especificidade dos marcadores re, pax8 e hbme para identificação de carcinomas de sítio primário em ovário em efusões e lavado peritoneal	58
5.9.	Análise da expressão do painel com GATA-3, PAX8 e TTF-1 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma em mulheres.	62
6.	DISCUSSÃO	64
6.1.	Tipo, frequência e diagnóstico das amostras.	64
6.2.	Sensibilidade e especificidade dos marcadores RE e GATA-3 para identificação de carcinoma de mama metastático em efusões	66
6.3.	Sensibilidade e especificidade dos marcadores PAX8, HBME e RE para identificação de carcinoma de sítio primário em ovário em efusões e lavado peritoneal.	69
6.4.	O painel imunocitoquímico inicial e seu algoritmo diagnóstico.	73
6.5.	Limitações do estudo.	79
7.	CONCLUSÕES	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8.	ANEXOS	102
8.1.	Técnicas utilizadas:.....	102
8.2.	Parecer substanciado do comitê de ética em pesquisa.	105
8.4.	CARTA DE ACEITAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL PARA PUBLICAÇÃO	109

1. INTRODUÇÃO

1.1.EFUSÕES MALIGNAS E O PAPEL DA CITOPATOLOGIA

As efusões serosas são um tipo de espécime comum da rotina de um laboratório de citopatologia, e são obtidas por um simples procedimento de punção, este de baixo risco para o paciente, sendo raríssimas as complicações. Porém, à exceção de poucas e raras neoplasias primárias, exemplificadas pelo mesotelioma e o linfoma primário de cavidades, as efusões quando malignas são associadas a doenças avançadas, e em geral de mau prognóstico. (DAVIDSON, 2004).

Há mais de um século e meio as efusões são analisadas pela citomorfologia convencional, que se vale de características tintoriais, da forma e padrões de agrupamentos para diagnóstico, e da presença ou não de atipias citonucleares. (ENGELS *et al.*, 2019). A análise citomorfológica de efusões é uma técnica barata, sem necessidade de um aparato logístico superlativo, e que tem boa acurácia, mostrando-se de excelente relação custo-benefício em vários cenários clínicos. (HEISE; PAULA; LIMA, 2016; NASUTI; GUPTA; BALOCH, 2002). Entretanto, qualquer método analítico abriga limitações. Neste tipo de exame, há a dependência de treinamento adequado de profissional habilitado ao diagnóstico clínico-morfológico. Porém, mesmo em cenário ideal, a característica limitadora mais importante da citomorfologia convencional é que muitos cânceres de sítios primários diversos são morfológicamente similares. E a depender do grau de diferenciação da malignidade, doenças de mesma origem histogenética, mesmo que agrupadas na mesma entidade nosológica, podem se apresentar de maneira citomorfológica muito ampla. (ELSHEIKH; SILVERMAN, 2019).

Esta heterogeneidade morfológica foi o principal impeditivo para o desenvolvimento precoce desta técnica, que, somada ao pouco entendimento das neoplasias em geral, gerou mais de um século de estagnação tecnológica. (WRIGHT, 2015). Por outro lado, esta heterogeneidade fascina e intriga os estudiosos das neoplasias, somada aos contínuos avanços no conhecimento das neoplasias, torna-a uma especialidade médica que, conforme opinião sumarizada em um clássico livro texto coloca-se entre as mais belas fusões entre a arte e a ciência. (DEMAY, 2011). Doravante, entretanto, mesmo mesmerizados pelas características

artesanal da citopatologia, há de se ater ao rigor dos dados da qual podemos obter, para fins da observação de verdades científicas nas quais possam se basear diagnósticos e decisões clínicas.

Diante da heterogeneidade citomorfológica das neoplasias, o método citopatológico agrupa as alterações apresentadas em padrões, utilizando-se da forma de agrupamento das células, coesividade das mesmas entre si; tamanhos e formatos nucleares; e se há características de diferenciação de membrana ou intracitoplasmáticas. Muitas vezes, em um contexto clínico e aliados a outros exames complementares, os achados citomorfológicos são suficientes para firmar diagnóstico definitivo de malignidade e do sítio primário da lesão, ou então, recomendar outros exames complementares em fluxogramas simplificados. (DAVIDSON, 2004; PEREIRA, Telma C. *et al.*, 2006).

O carcinoma de sítio indeterminado por sua vez é uma situação clínica onde há o diagnóstico morfológico de malignidade, porém não há a determinação da origem da neoplasia epitelial. Define-se esta condição como neoplasia maligna de caráter epitelial, de estadiamento clínico avançado, com diagnóstico de sítio primário incerto mesmo após rigorosa correlação demais dados clínicos e da investigação diagnóstica de bom padrão. (ELSHEIKH; SILVERMAN, 2019; LOSA *et al.*, 2018). Estes são comumente diagnosticados por efusões com características citomorfológicas suficientes para atestar o padrão de malignidade, diferenciação provável epitelial, porém sem características morfológicas precisas. (ENGELS *et al.*, 2019; METZGEROTH *et al.*, 2008). Estimam-se de 3 a 5% dos carcinomas se apresentam desta maneira na população mundial. (CONNER; HORNICK, 2015).

As características morfológicas de carcinomas de sítios diversos também podem se confundir com o mesotelioma maligno, neoplasia primária oriunda das células de revestimento das cavidades. Uma recente publicação em nome de comissão de especialistas - *Peritoneal Surface Oncology Group International PSOGI* - recomenda para este diagnóstico biópsia da lesão por patologista especializado, com nível de evidência A, pois considera necessário para o diagnóstico final a realização de painel imuno-histoquímico. Refere que os mesoteliomas tem perfil imuno-histoquímico positivo para a calretinina, as citoqueratinas 5/6, a proteína do gene supressor tumoral WT-1, a podoplanina, e trombomodulina, sendo marcadores negativos Claudina 4, TTF-1, e antígeno carcinoembrionário. (KUSAMURA *et al.*, 2021).

Este presente texto indaga se o exame imunocitoquímico em efusões e lavado peritoneal pode colaborar ainda mais que o já atingido pelos achados citomorfológicos. Para tal, assumem-

se como premissa básica para a melhora a efetividade e acuidade deste exame que quanto maior o número de células analisadas, melhor a acurácia do exame, obedecendo-se assim o princípio de inferência estatística. (PEREIRA, Maurício Gomes, 2008). Assim, com mais células o material pode ser submetido a repetições válidas do ponto de vista citomorfológico para que outras técnicas laboratoriais possam ser sobrepostas. Várias técnicas de concentração de células são realizadas no intuito de obter não apenas maior adequabilidade das lâminas a serem estudadas, assim como a possibilidade de reprodutibilidade e submissão a outras técnicas laboratoriais agregadoras de informações outras que não apenas morfológicas. (ENGELS *et al.*, 2019). A evolução destas técnicas, desde a centrifugação, convencional ou por citocentrífuga, e a inclusão do concentrado celular em bloco de parafina – o *cell block* ou bloco celular foram acrescentados às rotinas de um laboratório de citomorfologia, com grande aumento da acurácia do método. (KHAN; OMAR; MICHELOW, 2012).

A utilização de materiais aglutinadores, como a agarose ou a formação de um coágulo pela adição de plasma e plasminogênio podem facilitar este processo, com a obtenção de material sólido a ser incluso no *cell block*. Esta última técnica possui aplicabilidade testada localmente. (CASTRO *et al.*, 2016).

Técnicas de concentração celular em monocamada também podem ser utilizados em efusões, para conseguir mais lâminas úteis aos demais testes, com bons resultados apesar do aumento do custo em relação à citocentrifugação e manufatura do *cell block*. (FETSCH *et al.*, 2002).

A vantagem do *cell block* é a maior possibilidade de repetições de lâminas das demais técnicas. Colorações especiais para evidenciar por exemplo glicoproteínas de muco, ou parasitos tornam-se possíveis, mas também, técnicas no sentido de evidenciar moléculas intracelulares que possam servir como marcadores de especificidade. (FETSCH *et al.*, 2002). São numerosas as moléculas que podem servir de alvo, pois são expressas de maneira diferente em cada tipo tissular. Podem se localizar na membrana celular, em componentes citoplasmáticos, nucleares ou nucleolares. Cada um destes marcadores deve ser validado para a sua utilização em um painel diagnóstico que possa, aliado a informes clínicos e imagenológicos, responder a principal pergunta quando da ocasião das efusões malignas, que é a origem histogenética destas células. (DABBS, 2018).

Historicamente, a técnica de detecção por meio da reação a anticorpos contra estes antígenos, e a amplificação do sinal estão em desenvolvimento desde a última metade do século passado. Em revisão bibliográfica que versa sobre controles para imunocitoquímica (BURRY, 2011), cita-se que os primeiros trabalhos em imunomarcção de antígenos foram realizados em material sérico, para insulina. Neste trabalho, utilizando-se de amostras de sangue, a insulina endógena foi detectada por cromatografia após reação com anticorpos obtidos de cobaias inoculadas com insulina. (YALOW; BERSON, 1960). Sternberger e colaboradores (1970) descreveram em um trabalho seminal a técnica da amplificação do sinal por cromógeno após reação antígeno-anticorpo, (STERNBERGER *et al.*, 1970), a forma que evoluiu para ser reprodutível em material emblocado em parafina. A evolução histórica trouxe esta técnica para a citologia, potencializando o uso desta para o refino diagnóstico nos casos duvidosos à morfologia. (BURRY, 2011; POMJANSKI *et al.*, 2005).

1.2. SAÚDE DA MULHER, CÂNCER E EFUSÕES

A incidência e a mortalidade do câncer de mama são ambas as mais altas dentre as neoplasias malignas nas mulheres. A última estimativa oficial é de 66.280 novos casos da doença para o ano 2020, com 18.068 óbitos em decorrência de cânceres deste sítio primário. Para o ovário, os números são também altos, estimados 6.650 novos casos e 4.123 mortes no mesmo período. A segunda maior causa de óbito por câncer em mulheres é o primário de pulmão, que agregado aos de mesma histogênese – traqueia e brônquios – somam 12.621 casos fatais em 2020. Interessante anotar-se que as neoplasias de sítio desconhecido estão tabuladas com números impressionantes, responsáveis por estimadas 5002 mortes em 2019. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018). Estes dados refletem a urgência no refinamento e implementação de técnicas diagnósticas que sejam reproduzíveis no ambiente do SUS, para diminuir estes tristes números.

O Hospital Universitário de Brasília é um dos Centros de Alta Complexidade em Oncologia do Distrito Federal, e sede da amostragem desta pesquisa. Como hospital público, atende exclusivamente pacientes oriundos do Sistema Único de Saúde – àqueles aos quais serão beneficiados pelos resultados obtidos.

1.3. A TÉCNICA CITOPATOLÓGICA

A citopatologia de efusões pode ser realizada com simples esfregaço do líquido obtido por punção aspirativa por agulha fina, ou ainda por drenagem intraprocedimental cirúrgica. A celularidade e o fundo das lâminas, os padrões de agrupamentos celulares, os tipos celulares e suas características nucleares e citoplasmáticas são estudados, pormenorizados e aplicados em algoritmos para conclusão diagnóstica. (DEMAY, 2011; PEREIRA, *et al.*, 2006).

Apesar de resolutivo em grande parte das efusões, muitas destas são paucicelulares o que torna a análise morfológica difícil, por inadequabilidade da amostra. (DOUGLAS, 1992). No exemplo abaixo da **Figura 1**, há células descoesas, com anisocariose, hipercromasia, citomegalia, achado citopatológico que, no contexto clínico e topográfico, permitiu o diagnóstico de malignidade.

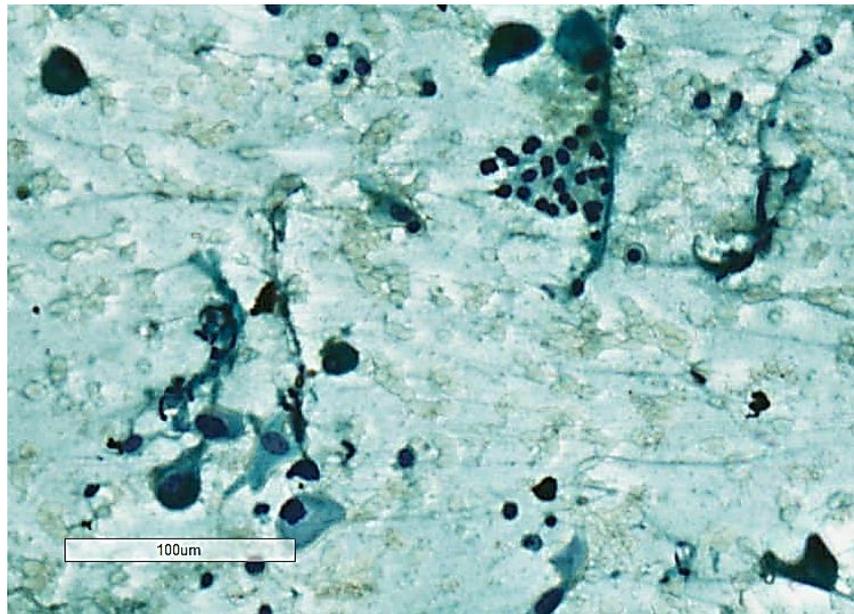


Figura 1. Exame citopatológico de Carcinoma anaplásico da tireoide, coloração Papanicolaou, 200x. Hospital Universitário de Brasília.

As efusões, deste modo, são submetidas a métodos de concentração de células, a fim de potencializar a visualização das mesmas e propiciar repetições metodológicas úteis para a sobreposição de colorações e da técnica de imunocitoquímica para refinamento diagnóstico. (DEMAY, 2011)

1.1.1. CELL BLOCK

O bloco celular (*cell block*) é uma técnica elegante no manuseio dos líquidos de efusões, pois concentra o material sólido em suspensão incluindo as células de qualquer natureza ou origem.

A técnica habitual consiste na citocentrifugação e pipetagem do material precipitado que fica ao fundo do tubo de ensaio, com a inclusão do mesmo em bloco de parafina à similaridade da técnica histológica convencional. Há variabilidade na técnica de citocentrifugação, com alterações nos passos de fixação e centrifugação, mostrando variabilidade entre estudos nas sensibilidades dos métodos, conforme demonstrado por Nathan e colaboradores em trabalho comparando-o com outros similares na literatura. (NATHAN *et al.*, 2000). Uma vez emblocado, o material é adequado para cortes e montagem em lâminas, sendo possível utilizar-se de colorações especiais e outras técnicas como a imunocitoquímica.

Há diversos meios para obter concentrações melhores e facilitar a inclusão deste material no bloco celular, como os métodos que aglutinam as células com a adição de agarose ou plasma-trombina/tromboplastina. (JING *et al.*, 2013).

O método plasma-tromboplastina/trombina é simples e rápido ao ser comparado com o método com ágar, tem menos passos metodológicos, dispensa aquecimento do meio de inclusão, podendo ser realizado à temperatura ambiente. Adiciona-se plasma e trombina/tromboplastina ao precipitado do centrifugado, formando um coágulo. Sólido, este material pode ser processado em metodologia idêntica às amostras histológicas – fixação, inclusão em parafina, cortes e repetições necessárias às colorações especiais, e a imunocitoquímica (CASTRO *et al.*, 2016; JING *et al.*, 2013). A técnica foi validada localmente, e o trabalho publicado por pesquisadores do laboratório da Patologia da Universidade de Brasília. Os blocos obtidos estão ilustrados na **Figura 2**. (CASTRO *et al.*, 2016).



Figura 2: Blocos celulares sob técnica de plasma-tromboplastina. Laboratório de Patologia da FM, UnB.

1.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOCITOQUÍMICA

A imuno-histoquímica consiste na demonstração de um antígeno, em geral epítopos de proteínas, por um sinal amplificado de uma reação antígeno-anticorpo. A técnica detecta moléculas no seu sítio celular, demonstrando, portanto, características moleculares em sua precisa localização à morfologia. (STERNBERGER *et al.*, 1970). O esquema foi ilustrado pelos autores do trabalho seminal desta técnica – realizado em material citológico, espiroquetas que são células procariotas - e está reproduzido na **Figura 3**. O resultado de uma versão moderna desta mesma técnica, realizada pelo autor deste manuscrito no Hospital Universitário de Brasília, está na **Figura 4**.

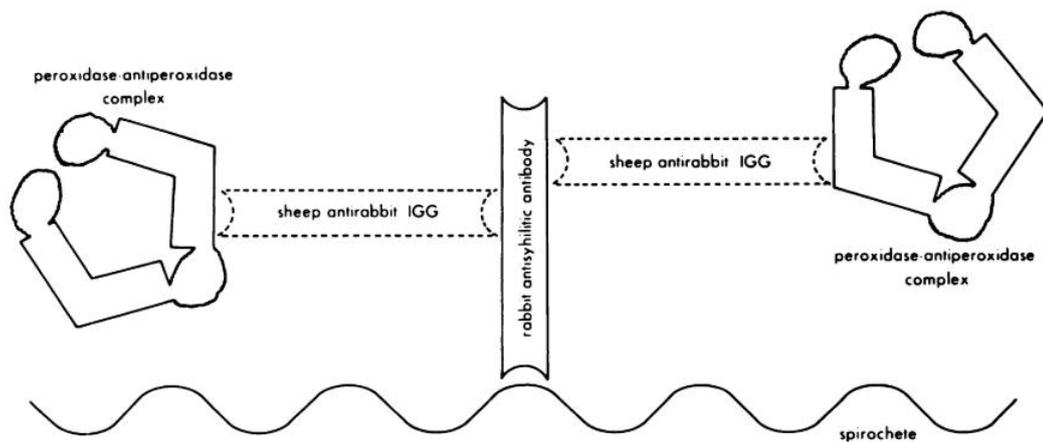


FIG. 1. Schematics of staining procedure by the unlabeled antibody peroxidase method using soluble peroxidase antiperoxidase complex (PAP). Step 1, rabbit antiserum to tissue antigen (e.g. spirochetes). Step 2, sheep antirabbit IgG. Step 3, PAP. Steps 4 and 5 (not shown), DAB and hydrogen peroxide followed by osmication.

Figura 3. Ilustração esquemática da reação imuno-histoquímica descrita por STERNBERG et al, 1970.

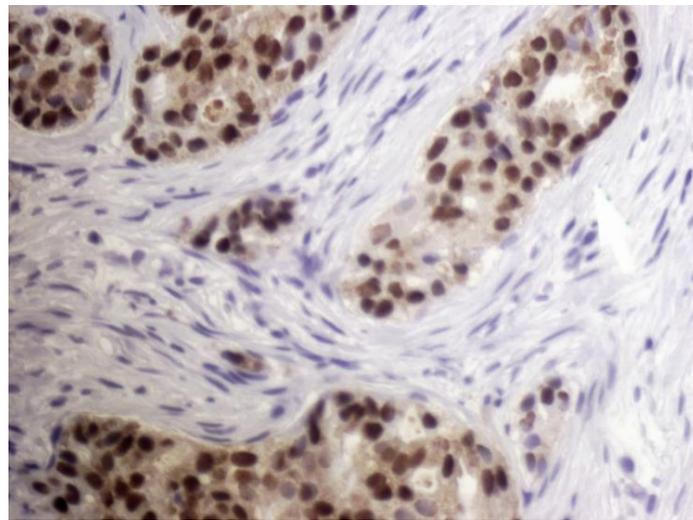


Figura 4: Imuno-histoquímica para RE em carcinoma mamário, 400x. Hospital Universitário de Brasília.

Apesar de existir o termo semântico imunocitoquímica, o cerne da técnica é o mesmo. A diferença entre os termos é dada apenas pela característica amostral – o substrato a ser testado, se tissular ou citológico – do que de diferenças substanciais dos imunoenaios utilizados. Várias são as formas de amplificação do sinal obtido da reação antígeno-anticorpo, com resultados

também diversos, mas sempre na intenção de potencializar a amplificação do sinal e contraste na marcação nos sítios celulares onde estão os antígenos. (DABBS, 2018).

Independentemente do método de amplificação da reação imunocitoquímica, há limitações intrínsecas ao método. Fatores pré-analíticos como a fixação e mesmo interação com reagentes dos passos intermediários podem influenciar na detecção. A amplificação pode não ocorrer devido a problemas intra-analíticos, como a titulação do anticorpo teste, ou falha na amplificação do sinal. (ENGEL; MOORE, 2011). Muitos anticorpos têm aplicabilidade clínica baixa, por vários motivos. Dentre estes, as reações cruzadas com outros antígenos tornando a sua amplificação comum a numerosos tecidos e numerosas neoplasias; a baixa prevalência nos tumores ao qual teoricamente se expressariam; ou ainda ao custo de produção elevado e indisponibilidade mercadológica. (DABBS, 2018).

1.5. DOS MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS

A escolha das moléculas a serem testadas sob a técnica de imunocitoquímica foi realizada através dos conhecimentos da histogênese das neoplasias malignas. As moléculas foram escolhidas dentre as disponíveis, e que nos trazem antígenos que tenham robustas diferenças entre os diversos sítios primários com aqueles aos quais se propõe detectar. A principal característica dos marcadores é a sua presumível existência nos tecidos proliferados, mesmo naqueles de pouca diferenciação que se tem menor similaridade morfológica aos tecidos adultos relacionados à sua histogênese. Além disso, todos os marcadores foram validados em testes em tecidos das neoplasias às quais se propõe detectar – as mais prevalentes na mulher.

Somando-se às moléculas que serão submetidas ao teste de hipótese, outros marcadores serão utilizados para a determinação de diferenciação epitelial, o que indica malignidade nas efusões, e para auxiliar na delimitação dos grupos de casos a ser testados com exclusão de diagnósticos diferenciais. Os três primeiros marcadores a seguir serão os propostos para o perfil inicial de marcadores em efusões e lavado peritoneal em mulheres, enquanto os demais serão auxiliares na delimitação dos grupos de neoplasias e na determinação de malignidade e benignidade das amostras.

1.5.1. GATA-3

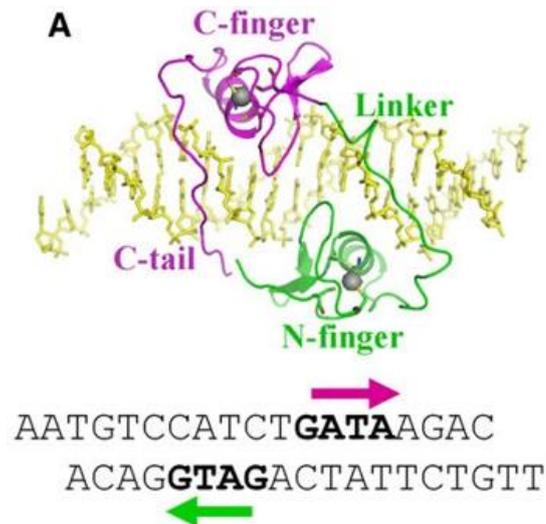


Figura 5. Estrutura esquemática da proteína GATA-3 e detalhe da sua codificação no gene GATA3. (CHEN *et al.*, 2012).

O marcador GATA-3 é uma proteína relacionada aos processos transcricionais associados ao zinco, e que regula a diferenciação de diversos tecidos durante a histogênese, tanto na embriogênese, quanto em processos reparativos e regenerativos. Seu nome se deve a estrutura molecular de seu gene, com a sequência guanina, adenosina, timidina e adenosina aparecendo em repetição. A proteína GATA-3 pertence a família de proteínas de regulação do movimento e proliferação celular. Epiderme e folículos, rim, mama, adipócitos, endotélio, tímócitos, linfócitos T e células trofoblásticas expressam esta proteína. O marcador, portanto, tem esperada expressão em neoplasias que se diferenciam a semelhança destes tecidos. O marcador é encontrado predominantemente em tecidos pancreáticos e uroteliais, pele, mas também na mama. (ASCH-KENDRICK; CIMINO-MATHEWS, 2016).

O marcador, deste modo, está recomendado para auxílio diagnóstico em tumores de mama e urotélio. (LIU *et al.*, 2012). Recente artigo de revisão estimou a positividade para este marcador em tumores de mama de até 94%, mesmo naqueles de menor diferenciação, os quais não expressavam mais receptores hormonais. (PENG *et al.*, 2017a). Apesar da positividade em

alguns tecidos e tumores, o uso em conjunto a outros marcadores, e considerando o padrão morfológico das células neoplásicas, tornam o GATA-3 útil na determinação do sítio primário de neoplasias metastáticas. (DE LARA *et al.*, 2018; ORDÓÑEZ, 2013).

Há evidência positiva do uso deste marcador em amostras citopatológicas, e portanto, por meio de imunocitoquímica. Comparando resultados de biópsias por agulha fina do sítio tumoral primário com os de líquidos de efusão em 40 pacientes, Braxton, Cohen e Siddiqui demonstraram grande correlação entre a expressão do GATA-3, similarmente à do receptor de estrógeno mostrando, portanto, adequabilidade do uso do GATA-3 em material citológico (BRAXTON; COHEN; SIDDIQUI, 2015).

O uso do marcador parece ainda mais importante em tumores de menor diferenciação, como naqueles de perfil molecular dito triplo-negativo. Neste subgrupo de carcinomas mamário, não há a expressão dos dois receptores hormonais – progesterona e estrógeno – e a oncoproteína HER2. Justamente neste grupo de tumores, o marcador tem demonstrado especial utilidade, pois na maioria dos casos pode ser encontrado a despeito da pouca diferenciação morfológica, conforme demonstrado em vários trabalhos com materiais histopatológicos. (CIMINO-MATHEWS *et al.*, 2013a; DEFTEREOS *et al.*, 2015; LEW *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2017b; REIS-FILHO; TUTT, 2008; YANG *et al.*, 2017).

A expressão de GATA-3, entretanto é apenas ocasional nos demais tumores do trato genital, e ainda mais rara em tumores ovarianos. (CLARK *et al.*, 2014). Esta característica torna ainda mais útil o seu uso para diferenciar a mama de tumores de outros sítios, em especial naqueles oriundos do trato genital feminino, neoplasias também usualmente positivas para receptores hormonais. Utilizando-se de efusões, foi obtida a positividade deste marcador em 58 de 62 tumores originários da mama, e, neste mesmo trabalho 244 outras amostras colhidas demonstram positividade esperada 100% para efusões malignas de tumores originários no rim e no testículo, mas a positividade para outros sítios primários foi bem menor. (LEW *et al.*, 2015).

1.5.2. PAX8

O PAX8 é a proteína produzida por uma família de genes relacionados à transcrição, e assim nomeados distinguidos pela sua ligação ao DNA – nominadamente “*paired – homeobox genes*”(DI PALMA *et al.*, 2013). Sua expressão está ligada à diferenciação celular em tecidos tireoidiano, metanéfricos e müllerianos em tecidos embrionários, mas permanece expresso em tecidos adultos a depender de sua diferenciação. Assim, é positivo em tecidos diversos como cerebelo, epitélio dos túbulos contorcidos renais, alças de Henle, túbulos coletores e células parietais do glomérulo; células B dos tecidos linfoides, células foliculares da tireoide, epitélio da tuba uterina, mucosa endometrial, porção proximal da uretra. (TACHA; ZHOU; CHENG, 2011)

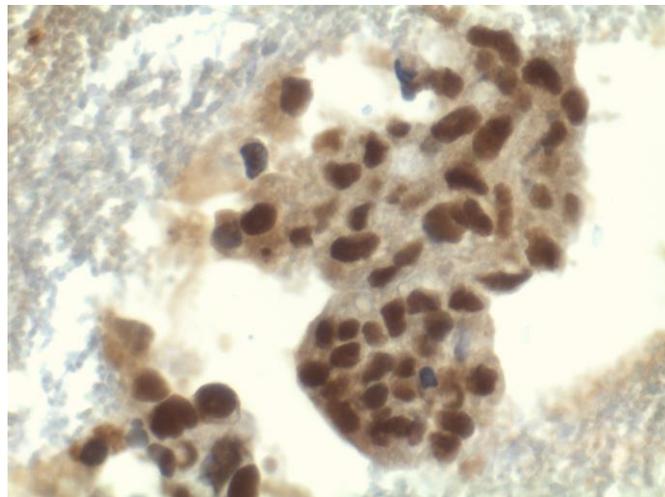


Figura 6: Imunocitoquímica em carcinoma ovariano metastático em lavado peritoneal, 400X. Imunoexpressão de PAX8. Hospital Universitário de Brasília.

Por conter especificidade à diferenciação tissular, sua presumível expressão em alguns, mas não todos os tumores tornam-no marcador útil para a diferenciação entre neoplasias metastáticas. Assim, o PAX8 vem sendo testado em vários tumores, principalmente àqueles

que se diferenciam em tecidos similares aos expressos nos tecidos maduros. Este marcador foi testado na diferenciação entre tumores metastáticos mamários e ovarianos. (NONAKA; CHIRIBOGA; SOSLOW, 2008). Dois estudos utilizam-se do marcador para fins de diferenciar tumores mesoteliais dos carcinomas serosos. A falta de expressão nos tumores mesoteliais em contraste à forte e frequente marcação em tumores serosos ovarianos sugerem que o marcador pode ser considerado específico para estes últimos (LAURY *et al.*, 2010)(LIN *et al.*, 2016) e excludente para o mesotelioma (TANDON *et al.*, 2018). Em outro estudo, há alguma ressalva para este uso dada a positividade deste marcador em raro subgrupo de mesoteliomas. (CHAPEL *et al.*, 2017).

Trata-se, portanto, de marcador bem-sucedido em diagnósticos da histogênese de lesão, e que está sendo continuamente validado também em citopatologia. Testado em situação específica para discernir mesotélio reativo de efusões malignas de tumores serosos, o marcador mostrou-se promissor em um estudo do início desta década (MCKNIGHT; COHEN; SIDDIQUI, 2010).

O marcador foi também testado para efusões malignas sendo considerado útil na distinção entre neoplasia müllerianas e não-müllerianas (TONG *et al.*, 2011) e em outro estudo, mostrando-se superior a outra proteína da mesma família – o PAX2 (WATERS *et al.*, 2014).

1.5.3. *TTF-1*

O marcador TTF-1 (do inglês *Thyroid transcription factor 1*) é o primeiro fator transcricional da tireoide a ser descrito, sendo proteína expressa durante os processos de diferenciação tissular na histogênese, e de onde presume-se sua função na organogênese. A proteína permanece expressa em células foliculares tireoidianas adultas, e posteriormente descrita também nos pneumócitos, assim como vários tumores malignos diferenciados nestes tecidos. (LAU; LUTHRINGER; EISEN, 2002). O marcador foi demonstrado em vários carcinomas pulmonares, dentre eles o adenocarcinoma pulmonar, assim como carcinomas de células pequenas do pulmão e de outras topografias. (FABBRO *et al.*, 1996).

A utilidade deste marcador está bem estabelecida. O marcador é citado em vários trabalhos nos quais são sugeridos algoritmos diagnósticos para carcinomas de sítio primário

desconhecido (CONNER; HORNICK, 2015; OIEN; DENNIS, 2012; SELVES *et al.*, 2018), justamente por sua descrita alta sensibilidade e especificidade para carcinomas de tireoide e pulmão. Particularmente para os carcinomas pulmonares, a expressão é vista em quase todos os tipos de carcinoma pulmonar, exceto os carcinomas escamosos. (JOHANSSON, 2004). Testado não somente em amostras tissulares histopatológicas, dos quais cito trabalho em larga escala onde mostrou-se expresso em 87% de 530 adenocarcinomas pulmonares (WARTH *et al.*, 2012); mas também em mostrou-se útil em algoritmos descritos para diagnóstico citopatológico em tumores de sítio desconhecido (CONNER; HORNICK, 2015; KIM, Jo Heon *et al.*, 2010; POMJANSKI *et al.*, 2005).

Estas características do marcador o tornam importante para o algoritmo diagnóstico proposto para este estudo, pois esta é a neoplasia mais prevalente no país. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018). A expressão do TTF-1 em tumores mamários apesar de existente, é excepcionalmente rara (KLINGEN *et al.*, 2010; TO; TSE, 2014; ZHAO, Lianhua *et al.*, 2019). Assim, o marcador se torna útil para diferenciar os carcinomas pulmonares, em especial adenocarcinomas. Este tipo histológico tem características morfológicas em efusões que são similares aos carcinomas mamários, porém justamente nestes, a positividade para TTF-1 é maior que nos outros tipos de tumores primários do pulmão. (JOHANSSON, 2004).

Bem estabelecido em literatura, o marcador auxiliará na determinação dos casos de carcinoma pulmonar para diferenciá-los dos casos de carcinoma mamários e ovarianos.

1.5.4. RE

O receptor de estrógeno (RE) é uma proteína expressa no núcleo de células e está presente em diversos tecidos do corpo. Atua na mediação de respostas transcricionais secundárias a ação hormonal. (KUMAR *et al.*, 1987). A sua presença tem sido estudada em diversas neoplasias, impulsionada principalmente pela sua importância prognóstica e terapêutica, pormenorizada a seguir.

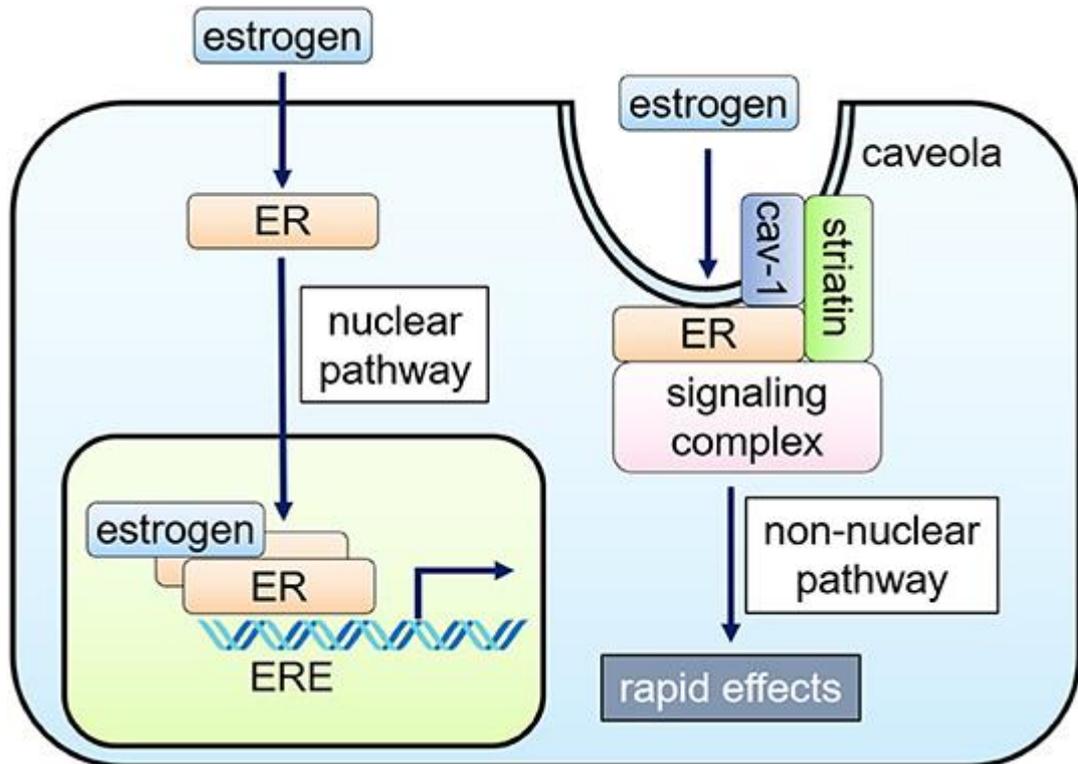


Figura 7: Diagrama simplificado das vias de sinalização do receptor de estrógeno. (UEDA *et al.*, 2020)

Nos carcinomas mamários, o receptor de estrógeno é fator prognóstico isoladamente, sendo o grupo que expressa este receptor à imuno-histoquímica de melhor prognóstico que o grupo sem expressão. (KNIGHT *et al.*, 1977). O receptor de estrógeno é também alvo terapêutico para neoplasias. O receptor de estrógeno integra o ciclo celular das células luminais fisiologicamente normais do tecido mamário, especialmente das células luminais secretoras. Nos carcinomas mamários que expressam este receptor, rotulados como de tipos luminais, o bloqueio farmacológico deste induz a inibição de seu crescimento. A imunomarcagem deste receptor, expresso morfológicamente em padrão nuclear (HARVEY *et al.*, 1999), é utilizada com grande segurança mesmo após décadas de sua validação para determinação de pacientes que se beneficiarão pelo bloqueio medicamentoso deste receptor. (NADJI *et al.*, 2005).

A aplicabilidade deste marcador em carcinomas de sítio indeterminado é ampla. Carcinomas do trato genital feminino e de mama expressam comumente este marcador. (KNIGHT *et al.*, 1977). Assim, torna-se frutífera a busca destes em efusões de pacientes com provável metástase destes tumores, conforme trabalho norte-americano realizado em 98 efusões malignas de sítios primários conhecidos, nas quais a positividade para receptor de estrógeno foi

observada em 75% dos tumores de mama, 50% dos endometriais, e 86% dos ovarianos (LEE, Benjamin H. *et al.*, 2002).

Um trabalho rotulado como piloto, utilizando-se exclusivamente de efusões pleurais malignas em carcinomas de mama, compara os marcadores úteis para a determinação do perfil molecular dos carcinomas mamários – receptores hormonais de estrógeno e progesterona – encontrou boa correlação e avaliou como plausível o teste deste marcador para efusões, mesmo considerando as limitações do desenho do estudo. (FRANCIS *et al.*, 2016). Posteriormente, um trabalho estudou este marcador sob a perspectiva de tratamentos adjuvantes, e constatou a perda de expressão deste marcador pós-tratamento hormonal, mostrando que o dinamismo evolutivo das neoplasias deve ser sempre considerado ao momento do diagnóstico. (SCHRIJVER *et al.*, 2017). Doxtader e Chute, pesquisadores de Cleveland, recentemente publicaram trabalho considerando o uso do receptor de estrógeno em Carcinomas de sítio indeterminado para fins do diagnóstico diferencial. (DOXTADER; CHUTE, 2018).

A utilização deste marcador tem uma utilidade adicional, pois é um bom parâmetro comparativo às demais reações de imunomarcação, posto que, extensamente estudado e utilizado, são conhecidas as variáveis que interferem na acurácia do teste, descritas por Diaz e Sneige em estudo de revisão de literatura especificamente para este fim. Os autores discorrem sobre variáveis intra-analíticas, pré-analíticas, variáveis interpretativas e de controle de qualidade, concluindo que há, pela própria natureza do tipo de ensaio, variações interlaboratoriais e interobservadores. (DIAZ; SNEIGE, 2005). Utilizar este marcador pode contribuir no controle de qualidade das demais reações, pois estarão em condição laboratorial similar.

1.5.5. *HBME*

Trata-se de um anticorpo monoclonal desenvolvido contra uma suspensão de células de um mesotelioma maligno humano. Seu nome é um acrônimo das iniciais do principal pesquisador do laboratório que a desenvolveu e a palavra mesotelial - *Hector Battifora*

Mesothelial cell. O clone utilizado é mencionado como HBME-1 (ATTANOOS; GODDARD; GIBBS, 1996; DE MATOS *et al.*, 2005). Devido sua origem, é um marcador mesotelial por excelência, com boa sensibilidade para mesoteliomas, mas com relativamente menor especificidade, por ser expresso em pequenos subgrupos de neoplasias não-mesoteliais, como pulmão e ovário. (FETSCH; ABATI; HIJAZI, 1998; OKAMOTO, 2009).

A expressão não-mesotelial também pode ser útil. Uma notável aplicabilidade é na diferenciação de lesões malignas, em especial o carcinoma papilar de seus diferenciais benignos em tireoide. (DE MATOS *et al.*, 2005). Somando-se a demais marcadores, seu uso é extensível a efusões malignas, ajudando em diagnósticos diferenciais entre lesões mesoteliais reativas, e das metástases de órgãos como mama. (ASCOLI *et al.*, 1997; JING *et al.*, 2013; MOCANU; CÎMPEAN; RAICA, 2006).

1.5.6. MOC-31 e Claudina-4

O marcador MOC-31 é anticorpo contra um epítipo do domínio I EGF-símile da EpCAM. Esta proteína é encontrada em células epiteliais e ausente nas mesoteliais, (BAIZAR *et al.*, 1999; SCHNELL; CIRULLI; GIEPMANS, 2013). Alguns trabalhos mostram-no como marcador sensível, sendo testado em histopatologia (OATES; EDWARDS, 2000), mas especialmente útil em efusões, posto que nestas, como a glicoproteína não está presente em células mesoteliais significa, portanto, a presença de uma célula estranha a topografia amostral, e portanto, caracteriza diferenciação epitelial e em efusões, significa metástase carcinomatosa (ATHANASSIADOU *et al.*, 2000; EDWARDS; OATES, 1995; MORGAN *et al.*, 1999; PAI; WEST, 2009).

Edwards e Oates testaram o marcador MOC-31 em um ensaio em microarranjos tissulares sob técnica de imuno-histoquímica, com apenas uma de trinta uma amostras negativas. (EDWARDS; OATES, 1995). Usando-se em peças cirúrgicas e de necropsia com mesoteliomas e comparação a adenocarcinomas, estes mesmos pesquisadores da Universidade de Birmingham mostraram positividade em 90% dos 40 adenocarcinomas amostrados, enquanto apenas 5% de amostras equívocas ou positivas em mesoteliomas, e nenhuma marcação em pleuras reativas. (OATES; EDWARDS, 2000). O marcador, entretanto, é ainda mais eficaz em efusões, com alta sensibilidade em alguns estudos. Um estudo americano, contendo 57 casos

entre várias neoplasias e efusões benignas mostrou o marcador com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade. (MORGAN *et al.*, 1999). Um estudo realizado em Atenas, Grécia, mostra o marcador positivo em 88,8% das efusões morfológicamente malignas e negativo em todas as morfológicamente benignas. (ATHANASSIADOU *et al.*, 2000).

O marcador Claudina-4 é uma proteína transmembrânica tetraspânica – ou seja, que possui quatro regiões transmembrânicas e vários domínios intracitoplasmáticos. A proteína é parte estrutural na formação das ligações apertadas (*tight junctions*, estruturas relacionadas à adesividade intercelular dos tecidos epiteliais. (LAL-NAG; MORIN, 2009). Lonardi e colaboradores relatam a total negatividade deste marcador em 115 amostras de mesoteliomas e efusões benignas, comparativamente a apenas 2 negativos em 228 carcinomas metastáticos para pleura de diversos sítios primários. (LONARDI *et al.*, 2011).

Pesquisa da Universidade de Brasília testou ambos os marcadores em efusões e lavados peritoneais usando-se da metodologia empregada neste trabalho logrando sucesso com 96% de positividade para MOC-31 e 100% para Claudina-4, abrindo caminho para utilizá-los como critérios de inclusão no presente estudo. (CARNEIRO *et al.*, 2019).

1.5.7. Calretinina.

A calretinina é uma proteína de ligação ao cálcio, que tem função de tampão intracelular a fim de evitar aumentos anormais da concentração de cálcio intracelular. Devido a esta função homeostática, esta proteína está expressa em diversos tecidos normais do corpo humano, em especial neurônios, células de Leydig do testículo, células tecais e luteinizadas do ovário, além de células mesoteliais. (LUGLI *et al.*, 2003). Estudos mostram que é muito útil na diferenciação entre adenocarcinomas de numerosos sítios primários do mesotelioma, no qual é consistentemente positivo (DOGLIONI *et al.*, 1996; LUGLI *et al.*, 2003; PORCEL, 2018).

O uso em imunocitoquímica de efusões é bem documentado, e dentre as diversas possibilidades de uso, mostram-se consistentes os resultados mostrando positividade em células mesoteliais reativas e em mesotelioma comparativamente à negatividade dos adenocarcinomas metastáticos de diversos sítios (GRIEBEL *et al.*, 2000; LEW *et al.*, 2015). O marcador não é útil, entretanto, na diferenciação entre células benignas reativas das células malignas do

mesotelioma em efusões. (SIMSIR *et al.*, 1999). A calretinina abriga falhas com rara positividade em alguns tipos específicos de carcinoma metastático, porém em um contexto morfológico correto (DOGLIONI *et al.*, 1996), e considerando-se o seu padrão de marcação (CHHIENG *et al.*, 2000), pode auxiliar para a definição de diferenciação mesotelial. Reforça o uso do marcador o fato das efusões benignas costumeiramente possuir menor celularidade, sendo este critério por si só auxiliar diagnóstico (PEREIRA, *et al.*, 2006).

Ressalvas feitas, o marcador está incluído no estudo para a confirmação e triagem dos casos caracterizando as células mesoteliais e excluindo diferenciação glandular, fazendo parte do painel necessário para diagnóstico em imunocitoquímica.

2. JUSTIFICATIVA

Efusões com suspeita de carcinoma de sítio desconhecido são comuns e frequentes. A predição do sítio primário por métodos com menor invasividade diminui potenciais injúrias de procedimentos mais invasivos, tempo e custo de internação. (MOHANTY; DEY, 2003)

Os carcinomas de ovário e mama estão entre os sítios primários de carcinoma que mais frequentemente evoluem com metástase para cavidades em mulheres. (KOSS; MELAMED, 2005). A saúde da mulher é reconhecidamente um dos principais focos de atenção à saúde, dada a grande prevalência das doenças. Além disso, é dever do cientista em saúde atender os anseios da população e da sociedade que o cerca.

O *cell block* de amostra de efusões possibilita a realização de vários cortes histológicos, nos quais é possível realizar a técnica imunocitoquímica com vários marcadores. Devido ao seu baixo custo, à disponibilidade dos reagentes e equipamentos, alta acurácia e diferentes aplicações, a imunocitoquímica é ainda o método auxiliar de escolha em laboratórios de anatomia patológica. (LI *et al.*, 2021; SUNDLING; CIBAS, 2018; YU; GLASER; GUSTAFSON, 2020).

As evidências da literatura frente aos marcadores selecionados - GATA-3, PAX8, e TTF-1 – sugerem que são marcadores úteis para exames citopatológicos de efusões na confirmação dos sítios primários em mama e ovário, contrastando-os com o sítio primário pulmonar.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a sensibilidade e a especificidade de marcadores de mama e ovário quando utilizados isoladamente e em painel imunocitoquímico para definição de sítio primário de carcinoma em amostras de efusões e lavado peritoneal, pela técnica de *cell block* com plasma e tromboplastina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade e a especificidade de GATA-3 e receptor de estrógeno como marcadores de sítio primário de mama em amostras malignas e benignas de efusões e de lavado peritoneal.
- Determinar a sensibilidade e a especificidade de PAX8, HBME e receptor de estrógeno como marcadores de sítio primário de ovário em amostras malignas e benignas de efusões e de lavado peritoneal;
- Determinar, em amostras de efusões e de lavado peritoneal, o escore de positividade de GATA-3 e receptor de estrógeno para carcinoma de mama e o escore de positividade de PAX8, HBME e RE para carcinomas de ovário.
- Determinar, em amostras de efusões e de lavado peritoneal, a sensibilidade e especificidade, bem como o escore de positividade de TTF-1 para pulmão.
- Determinar, em amostras de efusões e de lavado peritoneal, a sensibilidade e a especificidade quando se utiliza um painel com GATA-3, PAX8 e TTF-1 para identificação de sítio primário de carcinoma em mama, ovário e pulmão em mulheres.

4. METODOLOGIA

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 a 2020, de pacientes de ambos os sexos.

Os critérios para inclusão das amostras malignas foram: amostras com diagnóstico citológico e imunocitoquímico de carcinoma, com no mínimo cinco agrupamentos de células carcinomatosas, com positividade para MOC-31 e Claudina-4. (BRAXTON; COHEN; SIDDIQUI, 2015)

Os critérios para inclusão das amostras benignas foram: 1) amostras de pacientes sem diagnóstico prévio ou atual de câncer 2) amostras com pelo menos 20 células mesoteliais positivas para HBME e calretinina em cortes de *cell block*.

4.1.1. 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 conforme documento em (Anexo A).

4.2. PREPARO DO *CELL BLOCK* PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA

Para o preparo do *cell block* foi utilizado o método plasma-tromboplastina seguindo as seguintes etapas:

1. Centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos
2. Remoção do sobrenadante
3. Adição de 100 µL de plasma ao precipitado seguida de homogeneização

4. Adição de 100 µL de tromboplastina (Stago®, Asnières sur Seine, França) seguida de homogeneização.
5. Após a formação do coágulo, adição de 2 mL de formol a 10% para promover o deslocamento do coágulo do fundo do frasco e a fixação da amostra.
6. Inserção do coágulo (envolvido por papel manteiga) em cassete.
7. Inserção do cassete em frasco com formol a 10%.
8. Processamento histológico habitual.
9. Inclusão em parafina.
10. Secção dos blocos de parafina em cortes de 4-5 µm que foram dispostos em lâminas não silanizadas, para coloração por hematoxilina e eosina, e em lâminas silanizadas para imunocitoquímica.

4.3. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

A coloração HE foi realizada nas seguintes etapas:

1. Desparafinização com xilol
2. Hidratação em banhos com soluções de concentrações decrescente de etanol (em sequência) e água.
3. Coloração com Hematoxilina de Harris por 3 minutos,
4. Lavagem em água corrente
5. Coloração com eosina
6. Lavagem em água
7. Desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol (em sequência)
8. Diafanização com xilol
9. Montagem da lamínula sobre a lâmina utilizando resina sintética.

4.4. IMUNOCITOQUÍMICA.

A imunocitoquímica foi realizada através das seguintes etapas:

1. Desparafinização em xilol
2. Hidratação em soluções com concentrações decrescentes de etanol (em sequência).

3. Recuperação antigênica com tampão citrato e monolaurato de polietileno glicol sorbitano (Tween 20, Sigma-Aldrich®, San Luis, Estados Unidos da América) dentro de um vaporizador previamente aquecido à 95°C, em temperatura controlada de 95° a 99°C por 20 min
4. Resfriamento em temperatura ambiente por 20 min.
5. Lavagem em 10 cubas contendo água destilada.
6. Bloqueio de peroxidases endógenas em 2 cubas contendo água destilada e peróxido de hidrogênio na proporção 1:3 (2 banhos de 15 min cada)
7. Lavagem em 5 cubas contendo água destilada
8. Bloqueio de proteínas inespecíficas com a utilização do bloqueador do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience®, Califórnia, Estados Unidos) por 10 min.
9. Lavagem em 5 cubas contendo água destilada.
10. Lavagem com TBS-tween 20 (0,1%), por 5 min.
11. Diluição dos anticorpos em albumina humana 1%, conforme diluição em **Tabela 1**.
12. Incubação com os anticorpos primários em câmara úmida “overnight” sob refrigeração (2 a 8 °C).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica

Anticorpo	Marca do anticorpo	Clone	Diluição	Controle
TTF-1	DAKO	8G7G3/1	1:50	Tireoide
GATA-3	CELL MARQUE	L50-823	1:300	Mama
PAX8	MEDAYSIS	MD11R	1:400	Tireoide
Receptor de estrógeno	ABCAM	6F11	1:300	Mama
Anti-célula mesotelial	CELL MARQUE	HBME-1	1:50	Tireoide
Calretinina	DAKO	DAK-Calret 1	1:50	Peritônio
Claudina-4	NOVEX	AB15104	1:200	Ca Gástrico
Antígeno epitelial específico	DAKO	MOC-31	1:100	Ca Gástrico

13. Lavagem com TBS-tween por 5 min
14. Incubação com o anticorpo secundário biotilado do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience®, Califórnia, Estados Unidos) em câmara úmida à temperatura entre 18 a 22 °C por 20 minutos.
15. Lavagem com TBS-tween 20 por 5 min
16. Incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience®, Califórnia, Estados Unidos) em câmara úmida à temperatura entre 18 a 22 °C por 20 minutos.
17. Lavagem com TBS-tween por 5 min.
18. Adição de substrato cromogênico 3-4, diaminobenzidina - DAB - do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience®, Califórnia, Estados Unidos) com tampão de diluição próprio, revelação - marrom ou levemente turvado de marrom - em até 10 min.
19. Lavagem em água destilada em dois banhos de 2 minutos cada.
20. Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos

21. Lavagem em água corrente,
22. Desidratação em soluções com concentrações crescente de etanol (70%, 80% 99%, 99%, 99% sequencialmente) e diafanização em xilol.
23. Montagem da lamínula na lâmina resina sintética.
24. Na análise da imunocitoquímica foi utilizado o “quick score” conforme disposição abaixo (LEAKE *et al.*, 2000):

Escore de proporção

0 = sem marcação nuclear

1 = <1% de marcação nuclear

2 = 1-10% de marcação nuclear

3 = 11–33% de marcação nuclear

4 = 34 a 66% de marcação nuclear

5 = 67–100% de marcação nuclear

Somando-se os 2 escores, o escore total máximo é 8.

Escore de intensidade

0 = sem marcação

1 = marcação fraca

2 = marcação moderada

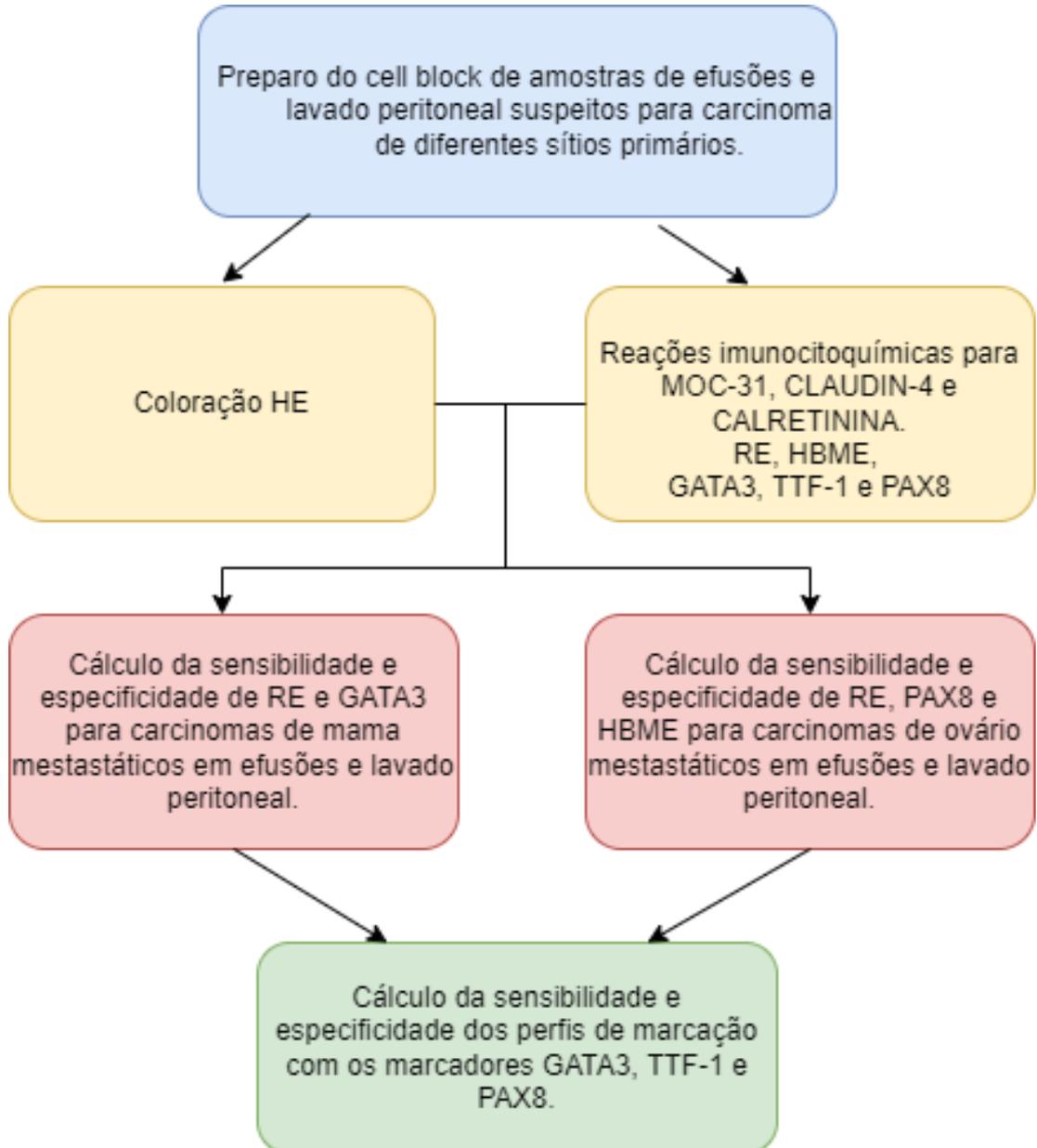
3 = marcação intensa

Para o marcador HBME, de marcação de membrana citoplasmática, o *quick score* foi adaptado livremente pelo autor, para fins de cálculo estatístico. Os controles das reações imunocitoquímicas foram obtidos de material de banco de tecidos, oriundos de materiais de peças cirúrgicas do Hospital Universitário, com mais de cinco anos após a liberação do laudo, conforme orientações de parecer da Sociedade Brasileira de Patologia sobre este assunto. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA, 2008). Os tipos de tecido utilizados estão também contidos na **tabela 1**.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa de computador *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, San Diego, CA) foi utilizado nas análises estatísticas considerando-se o nível de significância de $p < 0,05$. As análises realizadas foram o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia dos marcadores e a comparação das medianas dos escores de marcação entre os marcadores utilizando-se os testes Mann-Withney e Kruskal-Wallis.

4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. RESULTADOS

5.1. TIPO, FREQUÊNCIA E DIAGNÓSTICO DAS AMOSTRAS DE EFUSÕES E LAVADO PERITONEAL

Foram analisadas 131 amostras de efusões e lavado peritoneal, sendo estas de líquido pleural, n=56; líquido ascítico, n=39; líquido pericárdico, n=11; e lavado peritoneal, n=25.

Do total, foram identificados 78 carcinomas distribuídos de acordo com o tipo de amostra na seguinte frequência: líquido pleural, 40 amostras, 51,28%; líquido ascítico, 24 amostras, 30,76%; líquido pericárdico, 7 amostras, 8,97%; e lavado peritoneal, também 7 amostras, 8,97%. A frequência das amostras com carcinomas em pacientes do sexo feminino foi 76,92% (60/78) do total, 65% (26/40) das amostras de líquido pleural, 87,5 % (21/24) das amostras de líquido ascítico, 85,71% (6/7) das amostras de líquido pericárdico e 100% (7/7) das amostras de lavado peritoneal.

Os sítios primários dos carcinomas estão dispostos na **Tabela 2**. O sítio primário de carcinoma mais comum foi o de pulmão, seguido dos carcinomas de mama e ovário. Em mulheres, o sítio de carcinoma mais frequente foi mama seguido de ovário. Os carcinomas de mama e ovário corresponderam a 55% (33/60) do total de amostras de mulheres.

Tabela 2. Sítios primários dos carcinomas metastáticos em efusões e lavado peritoneal

Sítio primário	Total n=78	Mulheres
Pulmão	27	12
Mama	17	17
Ovário	16	16
Estômago	7	4
Peritoneal	3	3
Cólon	2	2
Colo de útero	3	3
Vias biliares	1	1
Pâncreas	1	1
Rim	1	1

A maioria dos tumores eram do tipo adenocarcinoma, entre as exceções há um carcinoma de pequenas células de pulmão e um carcinoma escamoso do colo de útero.. Todos os carcinomas mamários encontrados foram de tipo não-especial (anteriormente *ductal*), e dentre os carcinomas ovarianos, há um carcinoma de células claras, tipo incomum, mas ainda podendo ser considerado adenocarcinoma.

Nas amostras benignas de efusões e de lavados peritoneais (n=53), a frequência dos tipos de amostras foi a seguinte: líquido pleural, 30,18%; líquido ascítico, 28,3%; líquido pericárdico, 7,54%; e lavado peritoneal, 33,96%. Os diagnósticos dos pacientes com amostras benignas de efusões e de lavados peritoneais estão dispostos na **Tabela 3**. Nas amostras de efusões, os diagnósticos mais frequentes foram de peritonite e pleurite e, nas amostras de lavado peritoneal, de cistadenoma.

Tabela 3. Diagnósticos dos pacientes com efusões e lavados peritoneais benignos

Diagnóstico	n=53
Peritonite	15
Pleurite	12
Cistadenoma	6
Endometriose	4
Pericardite	3
Teratoma	2
Leiomioma	2
Insuficiência cardíaca	2
Colecistite	1
Fibroma	1
Pneumonia	1
Artrite reumatoide	1
Atrofia cística endometrial	1
Síndrome nefrótica	1
Tumor de Brenner	1

5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GATA-3

5.2.1 Expressão de GATA-3 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em mama

A expressão de GATA-3 foi observada em 100% (17/17) das amostras com carcinoma de mama. Os valores dos escores de proporção, intensidade e total estão dispostos na **Tabela 4**. A média (\pm dp) do escore de positividade foi de 6,65 (\pm 1,50), com mediana em 7,0 (variando de 4 a 8). A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 6**.

Tabela 4: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de GATA-3 em amostras de efusão com carcinomas de sítio primário em mama.

Casos	Proporção	Intensidade	Total
1	5	3	8
2	2	2	4
3	5	3	8
4	5	3	8
5	3	2	5
6	5	3	8
7	5	3	8
8	4	3	7
9	2	3	5
10	3	1	4
11	1	3	5
12	4	3	7
13	4	3	7
14	5	3	8
15	4	2	6
16	5	3	8
17	4	3	7

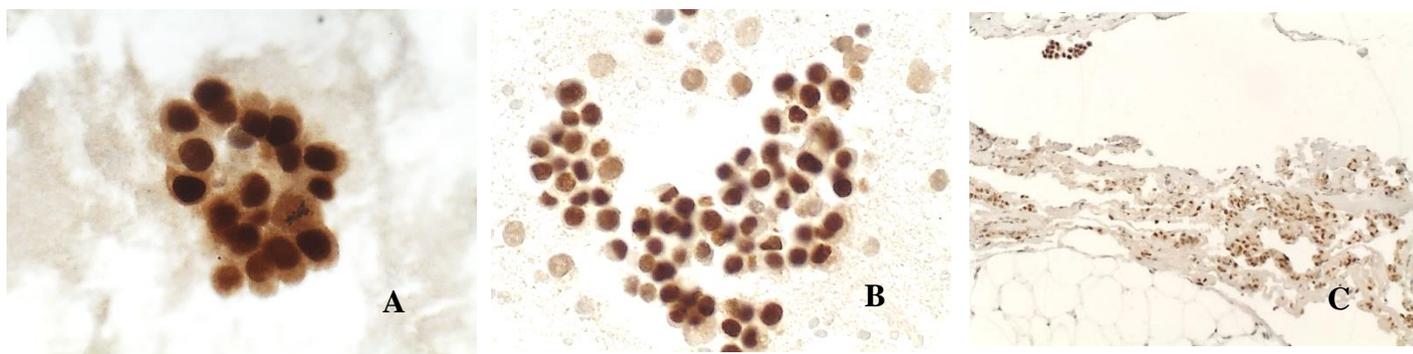


Figura 6: A e B, imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de GATA-3 em amostras de líquido pleural (A) e líquido pericárdico (B). C, imuno-histoquímica para GATA-3 em amostra de biópsia de pericárdio com carcinoma de sítio primário em mama. A, B e C (escore 5+3=8), (100X)

5.2.2 Expressão de GATA-3 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário, com carcinoma de outros sítios primários e em amostras benignas de efusões e lavados peritoneais

Não foi observada expressão de GATA-3 em 16 amostras de carcinoma de ovário e em 45 amostras de carcinoma de outros sítios primários (pulmão, n= 27; estômago n=7; peritoneal, n= 3; cólon, n=2; colo do útero, n= 3; vias biliares, n= 1, pâncreas, n=1 e rim=1).

Não houve expressão de GATA-3 em células mesoteliais, macrófagos e leucócitos

presentes em 53 amostras benignas de efusões e lavados peritoneais. Marcação citoplasmática inespecífica foi observada nas células de carcinoma dos diferentes sítios primários e nas células mesoteliais de amostras benignas, ilustrada abaixo na **Figura 7**.

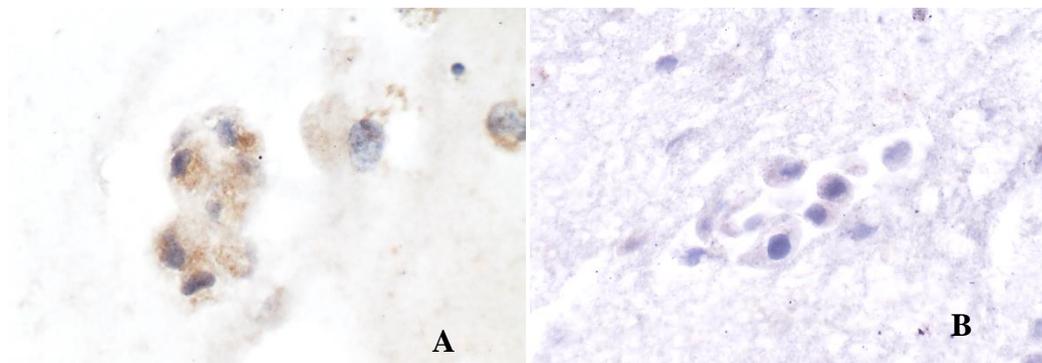


Figura 7: Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Marcação citoplasmática inespecífica de GATA-3 em amostra com carcinoma de sítio primário em cólon (A) e em células mesoteliais de amostras benignas de efusão (B).

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RE.

5.3.1 *Expressão de RE em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em mama*

A expressão de RE foi observada em 47,05% (8/17) das amostras com carcinoma de sítio primário em mama. Os valores dos escores de proporção, intensidade e total estão dispostos na **Tabela 5**. A média (\pm dp) do escore de positividade foi de 5,25 (\pm 1,04), a mediana 5,00, variando de 4 a 7. A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 8**.

Tabela 5: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de RE em amostras de efusão com carcinomas de sítio primário em mama.

Casos	Proporção	Intensidade	Total
1	2	3	5
2	4	3	7
3	2	2	4
4	3	2	5
5	2	2	4
6	3	2	5
7	3	3	6
8	3	3	6

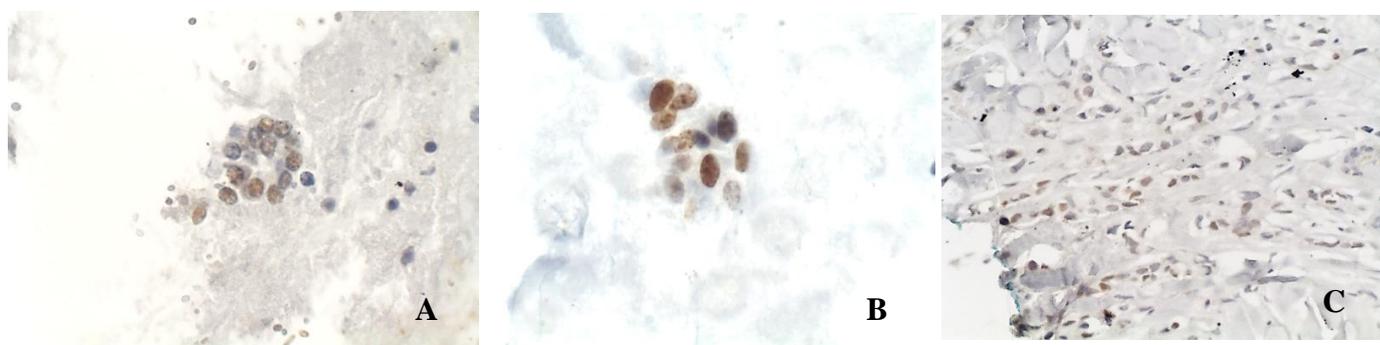


Figura 8: A e B imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de RE em amostras de líquido pleural com carcinoma de sítio primário em mama; em A, escore 2+3=5; em B, escore 3+2=5. C, imuno-histoquímica para RE em produto de mastectomia da mama., escore 4+3=7, 200X.

5.3.2 Expressão de RE em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário.

A expressão de RE foi observada em 37,5% (6/16) das amostras com carcinoma de sítio primário em ovário. Os valores dos escores de proporção, intensidade e total estão dispostos na **Tabela 6**. A média (\pm dp) do score de positividade foi de 5,5 (\pm 0,84), com mediana de 6,00, variando de 4 a 6. A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 9**.

Tabela 6: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de RE em amostras de efusão/lavado com carcinomas de sítio primário em ovário.

Casos	Proporção	Intensidade	Total
1	5	1	6
2	4	2	6
3	3	3	6
4	3	3	6
5	2	2	4
6	3	2	5

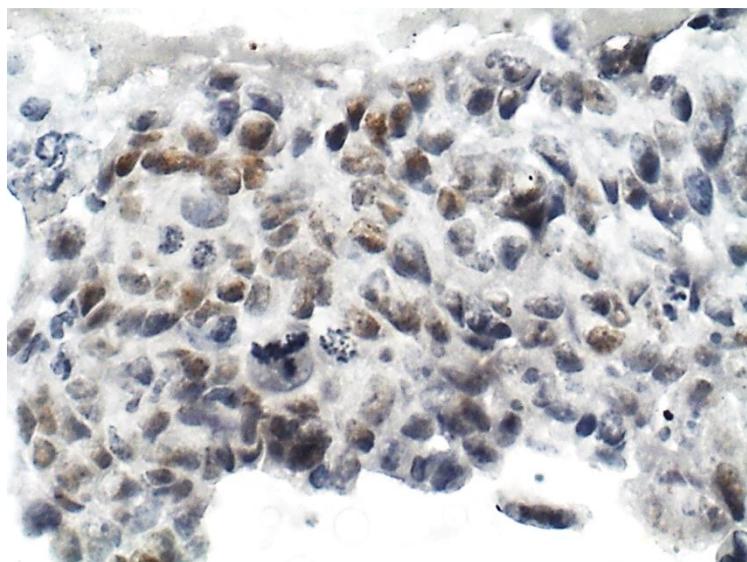


Figura 9: Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de RE em amostra de lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário, escore 4+2=6.

5.3.3 Expressão de RE em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de outros sítios primários e em amostras benignas de efusões e lavados peritoneais

A expressão de RE foi analisada em 45 amostras com carcinoma de outros sítios primários (pulmão, n= 27; estômago n=7; peritoneal, n= 3; cólon, n=2; colo do útero, n= 3; vias biliares, n= 1, pâncreas, n=1 e rim=1).

A expressão de RE foi observada em 33,33% (1/3) das amostras com carcinoma de colo de útero em 33,33% (1/3) das amostras com carcinoma peritoneal (1/3) (**Figura 10**). Nenhuma expressão de RE foi observada em amostras de outros sítios primários tais como pulmão, cólon, estômago, vias biliares, rim e pâncreas.

Não houve expressão de RE em células mesoteliais, macrófagos e leucócitos presentes

em 53 amostras benignas de efusões e de lavados peritoneais.

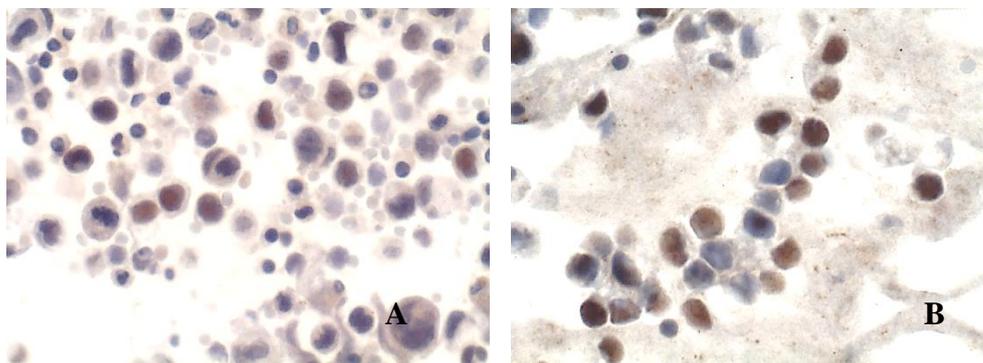


Figura 10: Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de RE em amostras de líquido pericárdico (A) e líquido ascítico (B), respectivamente com carcinoma de sítio primário em colo do útero e em peritônio. Em A e B, escore 4+3=7.

5.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PAX8.

5.4.1. Expressão de PAX8 em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário

A expressão de PAX8 foi observada em 93,75% (15/16) das amostras com carcinoma de ovário. Os valores dos escores de proporção, intensidade e total estão dispostos na **Tabela 7**. A média (\pm dp) do score de positividade foi de 6,53 (\pm 1,55), com mediana de 7,00, variando de 3 a 8. A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 11**.

Tabela 7: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de PAX8 em amostras de efusão/lavado com carcinomas de sítio primário em ovário

Casos	Proporção	Intensidade	Total
1	5	3	8
2	5	3	8
3	4	3	7
4	4	2	6
5	3	3	6
6	3	3	6
7	5	3	8
8	5	3	8
9	5	3	8
10	5	2	7
11	3	2	5
12	4	3	7
13	2	1	3
14	3	1	4
15	4	3	7

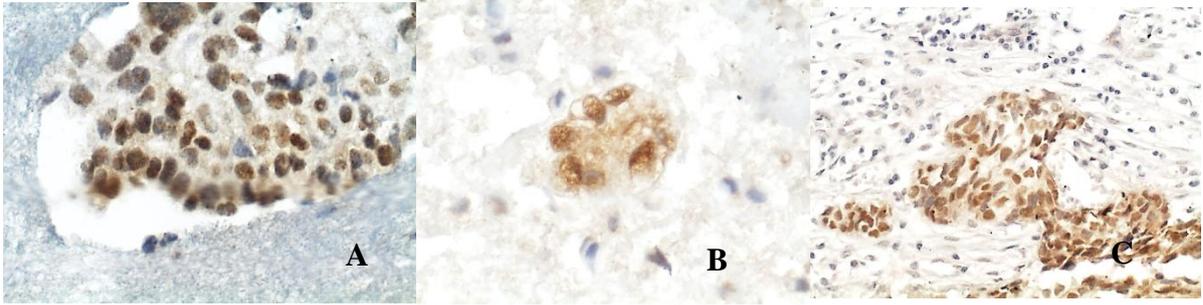


Figura 11: Imunocitoquímica em *cell block*, A e B (400 X). Expressão de PAX8 em amostras de efusão/lavado com carcinoma de sítio primário em ovário, A (escore 5+3=8) e B (escore 5+2=7). C, expressão de PAX8 em amostra de produto de ooforectomia, escore 5+3, 200X.

5.4.2 Expressão de PAX8 em carcinoma de mama e de outros sítios primários metastático em efusões e em efusões benignas

A expressão de PAX8 foi analisada em 17 amostras de carcinoma de mama e em 45 amostras com carcinoma de outros sítios primários (pulmão, n= 27; estômago n=7; peritoneal, n= 3; cólon, n=2; colo do útero, n= 3; vias biliares, n= 1, pâncreas, n=1 e rim=1).

A expressão de PAX8 foi observada em 100% (3/3) das amostras de carcinoma com sítio primário em peritônio, em 66,66% (2/3) das amostras com carcinoma de sítio primário em colo de útero e na amostra de carcinoma com sítio primário em rim. Nenhuma expressão de PAX8 foi observada em amostras de carcinoma de mama e de outros sítios primários tais como pulmão, cólon, estômago, vias biliares e pâncreas.

A expressão de PAX8 também não foi observada em células mesoteliais, macrófagos e leucócitos presentes em efusões benignas (0/53). A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 12**.

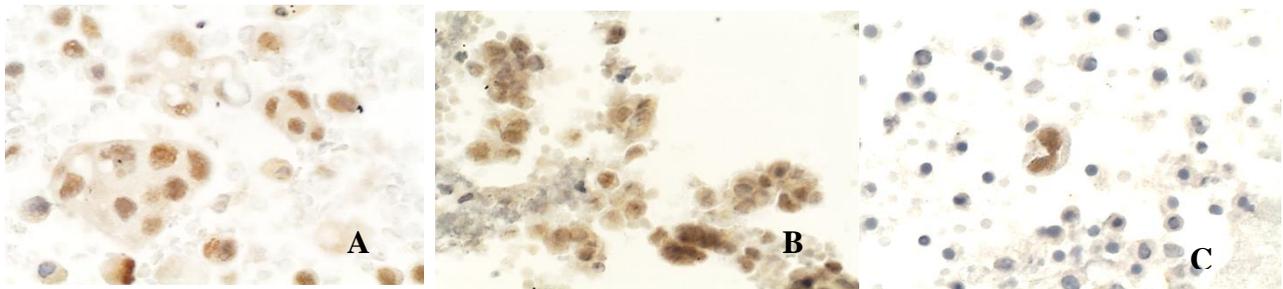


Figura 12: Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de PAX8 em amostra com carcinoma primário de peritônio(A), colo de útero (B) e rim (C). Escores: A, 5+3=8; B, 3+3=6; e C, 5+3=8.

5.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HBME.

5.5.1. Expressão de HBME em amostras de efusão e lavado peritoneal com carcinoma de sítio primário em ovário

A expressão de HBME foi observada em 87,5% (14/16) das amostras de carcinoma com sítio primário em ovário. Os valores dos escores de proporção, intensidade e total estão dispostos na **Tabela 8**. A média (\pm dp) do score de positividade foi de 6,21 (\pm 1,37), com mediana de 6,5, variando de 3 a 8. A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 13**.

Tabela 8: Escores de proporção, intensidade e total da expressão de HBME em amostras com carcinomas de sítio primário em ovário metastáticos em efusões

Casos	Proporção	Intensidade	Total
1	4	3	7
2	5	3	8
3	2	1	3
4	4	2	6
5	3	3	6
6	4	3	7
7	4	3	7
8	3	2	5
9	4	3	7
10	2	3	5
11	3	2	5
12	4	3	7
13	5	3	8
14	3	3	6

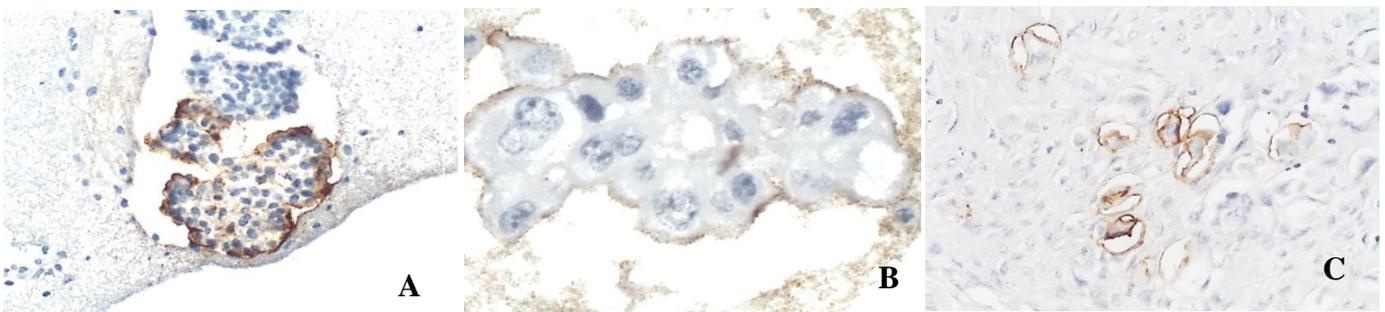


Figura 13: A e B, imunocitoquímica em *cell block*, 200X(A) e 400X(B). Expressão de HBME em amostras de líquido ascítico (A) e lavado peritoneal (B), ambas com carcinoma de sítio primário em ovário, A (escore 3+3=6) e B (escore 4+3=7). C, imuno-histoquímica para HBME em produto de ooforectomia com carcinoma de ovário, escore 4+3=7.

5.5.2 Expressão de HBME em carcinoma de mama e de outros sítios primários metastático em efusões e em efusões benignas

A expressão de HBME foi analisada em 17 amostras de carcinoma de mama e em 45 amostras com carcinoma de outros sítios primários (pulmão, n= 27; estômago n=7; peritoneal, n= 3; cólon, n=2; colo do útero, n= 3; vias biliares, n= 1, pâncreas, n=1 e rim=1).

A expressão de HBME foi observada em 25,92% (7/27) das amostras de carcinoma com sítio primário em pulmão, em 100% (3/3) das amostras com carcinoma de sítio primário em peritônio e em uma amostra de carcinoma com sítio primário em estômago. Nenhuma expressão de HBME foi observada em amostras de carcinoma de mama e de outros sítios primários tais como cólon, estômago, vias biliares e pâncreas.

A expressão de HBME foi observada em células mesoteliais em todas as efusões benignas. A marcação imunocitoquímica pode ser observada na **Figura 14**.

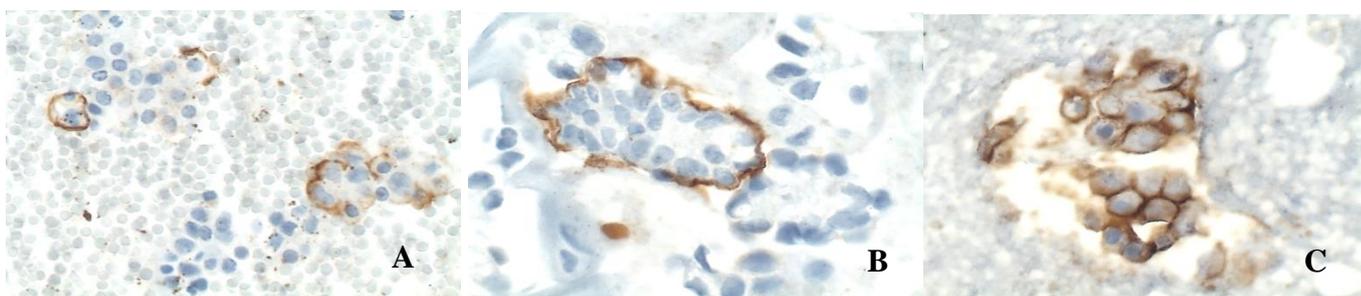


Figura 14: Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de HBME em amostras de líquido pleural (A) e ascítico (B), respectivamente com carcinoma de sítio primário em pulmão (escore 4+3=7) e em peritônio (escore 4+3=7) e em células mesoteliais (C) de lavado peritoneal de pacientes com cistadenoma (C, escore 4+3=7).

5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TTF-1

5.6.1. Expressão de TTF-1 em carcinoma de sítio primário em mama, ovário e de outros sítios em efusões e em efusões benignas

A expressão de TTF-1 foi observada em 88,88% (24/27) das amostras de carcinoma com sítio primário em pulmão, em 5,88% (1/17) das amostras com carcinoma de sítio primário em mama, em 14,28% (1/7) das amostras de carcinoma com sítio primário em estômago, e em 6,25% (1/16) das amostras de carcinoma com sítio primário em ovário. A marcação do caso primário de mama e do caso primário de estômago está exemplificada na **Figura 15**. Nenhuma

expressão de TTF-1 foi observada em amostras de carcinoma de outros sítios primários tais como cólon, peritônio, colo do útero, rim, vias biliares e pâncreas. A expressão de TTF-1 não foi observada em células mesoteliais, macrófagos e leucócitos presentes em efusões benignas (0/53).

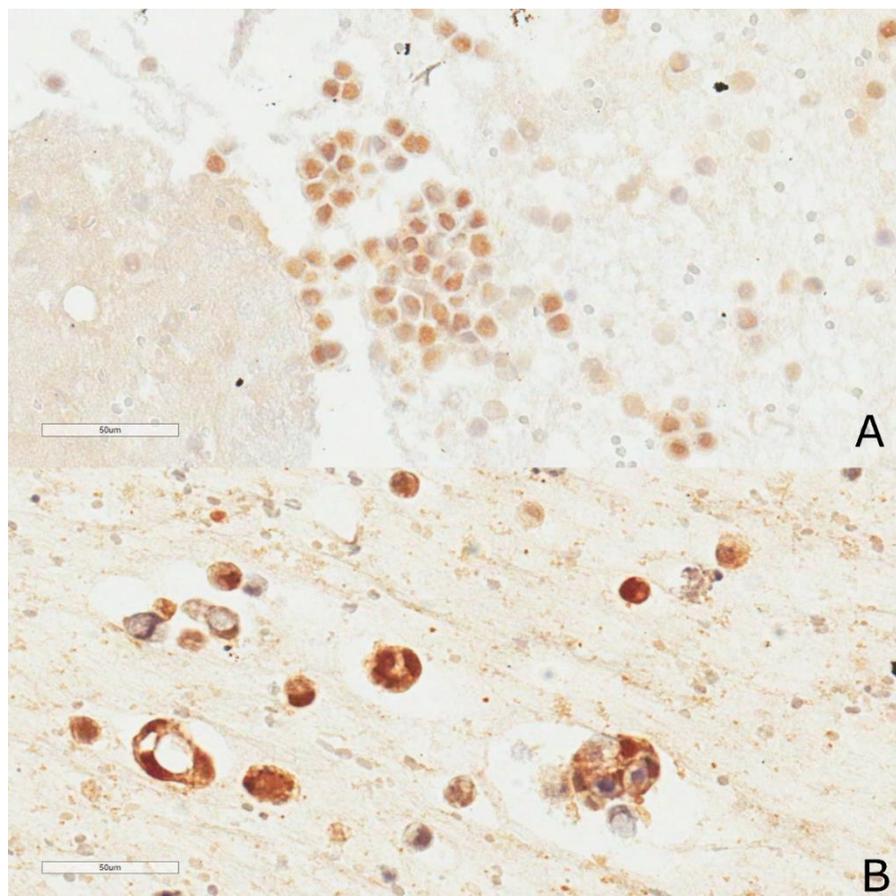


Figura 15: Imunocitoquímica em *cell block*, 400 X. Expressão de TTF-1 em amostra de líquido pericárdico com carcinoma de sítio primário em mama (A) e em amostra de líquido pleural com sítio primário em estômago (B).

5.7. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES RE E GATA-3 PARA DETECÇÃO DE CARCINOMA DE SÍTIO PRIMÁRIO DE MAMA EM EFUSÕES E LAVADO PERITONAL

Para a análise da sensibilidade de GATA-3 para detecção de carcinoma de mama em efusões, o número de amostras de carcinoma de mama com positividade para GATA-3 (n=17) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma mama (n=17), conforme ilustrado na **Tabela 9**. A sensibilidade de GATA-3 para detecção de carcinoma de mama em efusões, e foi

de 100% (17/17).

Para a análise da especificidade de GATA-3 para detecção de carcinoma de sítio primário em mama, o número de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto mama) com negatividade para GATA-3 somado ao número de efusões benignas com negatividade para GATA-3 ($n=61 + 53$) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto mama) somado ao número total de efusões benignas ($n=61 + 53$), dados também expressos na **Tabela 9**. A especificidade de GATA-3 para detecção de carcinoma de mama em efusões foi de 100%. O valor da acurácia é 100%.

Tabela 9: *Frequência de expressão de GATA-3 em carcinoma metastático para efusões/lavado e em células de efusões benignas.*

Sítio primário	GATA-3 + n	GATA-3 – n
Carcinoma		
Pulmão	0	27
Mama	17	0
Ovário	0	16
Estômago	0	7
Peritoneal	0	3
Cólon	0	2
Colo de útero	0	3
Vias biliares	0	1
Pâncreas	0	1
Rim	0	1
Efusões benignas	0	53

Para a análise da sensibilidade de RE para detecção de carcinoma de sítio primário em mama, o número de amostras de carcinoma de mama com positividade para RE ($n=8$) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma mama ($n=17$), o que está ilustrado na **Tabela 10**. A sensibilidade de RE para detecção de carcinoma de mama em efusões foi de 47,05% (8/17).

Para a análise da especificidade de RE para detecção de carcinoma de mama em efusões, o número de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto mama) com negatividade para RE somado ao número de efusões benignas com negatividade para RE ($n=53 + 53$) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto mama) somado ao número total de efusões benignas ($n=61 + 53$). A especificidade de RE para detecção

de carcinoma de mama em efusões foi de 92,98% devido à expressão de RE em amostras de carcinoma com sítio primário em ovário, colo de útero e peritônio. A acurácia é de 87,02%.

Tabela 10: *Frequência de expressão de RE em carcinoma metastático para efusões/lavado e em células de efusões benignas*

Sítio primário	RE+ n	RE- n
Carcinoma		
Pulmão	0	27
Mama	8	9
Ovário	6	10
Estômago	0	7
Peritoneal	1	2
Cólon	0	2
Colo de útero	1	2
Vias biliares	0	1
Pâncreas	0	1
Rim	0	1
Efusões benignas	0	53

O marcador GATA-3 foi mais sensível e mais específico que o RE para detecção de carcinoma de mama. A menor especificidade do RE para detecção de carcinoma de mama em relação ao GATA-3 ocorreu devido à positividade de RE em carcinoma de origem ovariana, peritoneal e endocervical. Estes dados estão comparados na **Tabela 11**.

Tabela 11: *Sensibilidade e especificidade dos marcadores RE e GATA-3 para detecção de carcinoma de mama metastáticos em efusões:*

	Sensibilidade	especificidade
RE	47,05%	92,98%
GATA-3	100%	100%

A mediana e os valores mínimo e máximo do escore total de expressão em carcinomas metastáticos de mama foram significativamente maiores para GATA-3 (7, 4-8) em relação ao RE (5, 4-7) (teste Mann-Withney, $p=0,02$). Estes podem ser comparados na **Figura 16**.

Carcinoma mamário em efusões

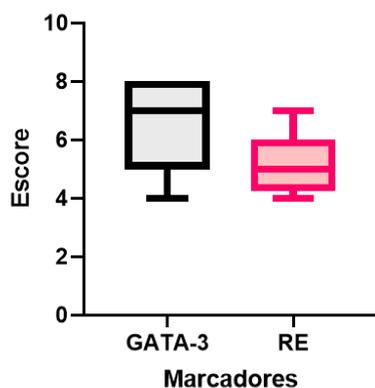


Figura 16: Mediana do escore total de expressão de GATA-3 e RE em carcinomas metastáticos de mama.

5.8. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES RE, PAX8 E HBME PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARCINOMAS DE SÍTIO PRIMÁRIO EM OVÁRIO EM EFUSÕES E LAVADO PERITONEAL

Para a análise da sensibilidade de RE para detecção de carcinoma de ovário em efusões, o número de amostras de carcinoma de ovário com positividade para RE (n=6) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma ovário (n=16), o que está a seguir na **Tabela 12**. A sensibilidade de RE para detecção de carcinoma de ovário em efusões foi 37,5% (6/16).

Para a análise da especificidade de RE para detecção de carcinoma de ovário em efusões, o número de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto ovário) com negatividade para RE somado ao número de efusões benignas com negatividade para RE (n=52+53) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto ovário) somado ao número total de efusões benignas (n=62+53), dados estes ilustrados também na **Tabela 12**. A especificidade de RE para detecção de carcinoma de ovário em efusões e lavado peritoneal foi de 91,30% devido à expressão de RE em amostras de carcinoma de sítio primário em mama, colo de útero e peritônio. A acurácia foi de 84,73%.

Tabela 12: *Frequência de expressão de RE em carcinoma metastático em efusões e lavado peritoneal, e em efusões benignas.*

Sítio primário	RE+ n	RE- n
Carcinoma		
Pulmão	0	27
Mama	8	9
Ovário	6	10
Estômago	0	7
Peritoneal	1	2
Cólon	0	2
Colo de útero	1	2
Vias biliares	0	1
Pâncreas	0	1
Rim	0	1
Efusões benignas	0	53

Para a análise da sensibilidade de PAX8 para detecção de carcinoma de ovário em efusões e lavado peritoneal, o número de amostras de carcinoma de ovário com positividade para PAX8 (n=15) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma ovário (n=16), a seguir na **Tabela 13**. A sensibilidade de PAX8 para detecção de carcinoma de ovário em efusões foi calculada em 93,75% (15/16).

Para a análise da especificidade de PAX8 para detecção de carcinoma de ovário em efusões, o número de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto ovário) com negatividade para PAX8 somado ao número de efusões benignas com negatividade para PAX8 (n=56+53) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto ovário) somado ao número total de efusões benignas (n=62+53), utilizando os dados da **Tabela 13**. A especificidade de PAX8 para detecção de carcinoma de ovário em efusões foi de 94,78%, devido à expressão de PAX8 em amostras de carcinoma com sítio primário em colo de útero, peritônio e rim. A acurácia foi de 94,65 %.

Tabela 13: *Frequência de expressão de PAX8 em carcinoma metastático para efusões/lavado e em células de efusões benignas.*

Sítio primário	PAX8+	PAX8-
	N	n
Carcinoma	N	n
Pulmão	0	27
Mama	0	17
Ovário	15	1
Estômago	0	6
Peritoneal	3	0
Cólon	0	2
Colo de útero	2	1
Vias biliares	0	1
Pâncreas	0	1
Rim	1	0
Efusões benignas	0	53

Para a análise da sensibilidade de HBME para detecção de carcinoma de ovário em efusões, o número de amostras de carcinoma de ovário com positividade para HBME (n=14) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma ovário (n=16), conforme a frequência de expressão deste marcador exposta na **Tabela 14**. A sensibilidade de HBME para detecção de carcinoma de ovário em efusões foi 87,5% (14/16).

Para a análise da especificidade de HBME para detecção de carcinoma de ovário em efusões, o número de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto ovário) com negatividade para HBME somado ao número de efusões benignas com negatividade para HBME (n=51+0) foi dividido pelo número total de amostras de carcinoma de outros sítios primários (exceto ovário) somado ao número total de efusões benignas (n= 62 + 53), com dados da **Tabela 14**. A especificidade de HBME para detecção de carcinoma de ovário em efusões foi de 44,34% devido à expressão de HBME em amostras de carcinoma de sítio primário em pulmão e peritônio e em amostras de efusões benignas. A acurácia do marcador foi calculada em 49,61%.

Tabela 14: *Frequência de expressão de HBME em carcinoma metastático para efusões/lavado e em células de efusões benignas*

Sítio primário	HBME + N	HBME - n
Carcinoma		
Pulmão	7	20
Mama	0	17
Ovário	14	2
Estômago	1	5
Peritoneal	3	0
Cólon	0	2
Colo de útero	0	3
Vias biliares	0	1
Pâncreas	0	1
Rim	0	1
Efusões benignas	53	0

Excluídas as efusões benignas, a sensibilidade permanece inalterada, porém a especificidade do marcador HBME neste aumenta para 82,25%, e a acurácia, 83,33%.

O marcador PAX8 foi o marcador de maior sensibilidade e especificidade. A associação de PAX8 + HBME+ aumentaria a especificidade do PAX8 de 94,78% para 97,39%, já que os carcinomas de colo de útero e rim não expressaram HBME. Utilizando-se desta associação, apenas os 3 carcinomas primários peritoneais seriam considerados falso positivos para carcinoma de ovário. Os carcinomas de peritônio apresentaram o mesmo padrão de expressão dos carcinomas de ovário (PAX8+ e HBME+), portanto mesmo com a associação dos 2 marcadores não seria possível diferenciar os carcinomas com origem nestes sítios.

A **Tabela 15** ilustra a comparação da sensibilidade e especificidade destes marcadores.

Tabela 15: *Sensibilidade, especificidade e acurácia dos marcadores RE, PAX8 e HBME para detecção de carcinoma de ovário metastáticos em efusões e lavado peritoneal:*

	sensibilidade	especificidade	acurácia
RE	37,50%	91,30 %	84,73%
PAX8	93,75%	94,78%	94,65%
HBME	87,50%	44,34%	49,61%
PAX8 e HBME	87,50%	97,39%	96,94%

A mediana e os valores máximo e mínimo do escore total de expressão em carcinomas metastáticos de ovário não foram significativamente diferentes para RE 6 (4-6), PAX8 7 (3-8) e HBME 6,5 (3-8), com $p=0,31$ (Kruskal-Wallis). Veja estes dados ilustrados na **figura 17**.

Carcinoma de ovário em infusões

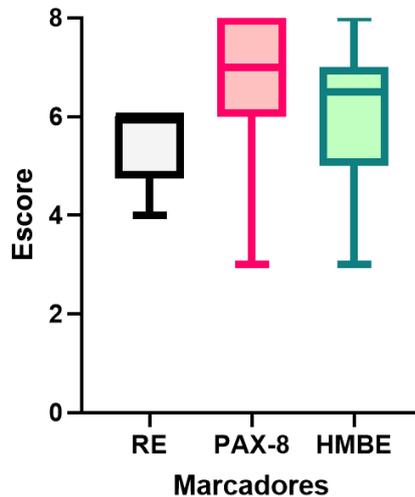


Figura 17. Mediana do escore total de expressão de RE, PAX8 e HBME em carcinomas metastáticos de ovário em efusões/lavado peritoneal

5.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PAINEL COM GATA-3, PAX8 E TTF-1 EM AMOSTRAS DE EFUSÃO E LAVADO PERITONEAL COM CARCINOMA EM MULHERES.

A sensibilidade e especificidade do perfil GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (-) para detecção do carcinoma mamário foram, respectivamente, 94,11% (16/17) e 100% (43/43). Uma das amostras de carcinoma mamário teve perfil diverso, com GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (+).

A sensibilidade e especificidade do perfil PAX8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (-) para a detecção do carcinoma ovariano foram respectivamente 87,50% (14/16) e 86,36% (38/44). Duas amostras tiveram perfil diverso, uma com PAX8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-) e outra, PAX8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (+).

A sensibilidade e especificidade do perfil TTF-1 (+), PAX8 (-) GATA-3 (-) para a detecção de carcinomas pulmonares foi, respectivamente, 83,33% (10/12) e 97,91% (47/48). Dois carcinomas pulmonares mostraram-se com perfil PAX8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-).

O perfil PAX8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-) para a detecção de carcinomas primários do

trato gastrointestinal – considerando as amostras com tumores primários do estômago e cólon foi de 83,33% de sensibilidade (5/6) e 88,88% de especificidade (48/54). Uma amostra gástrica teve perfil TTF-1 (+), PAX8 (-) e GATA-3 (-).

Abaixo, os achados estão sumarizados na **Tabela 16**.

Tabela 16: Perfil de marcadores por sítio primário.

Perfil de marcadores	GATA-3 (+) PAX8 (-) TTF-1 (-)	PAX8 (+) GATA-3 (-) TTF-1 (-)	TTF-1 (+) GATA-3(-) PAX8 (-)	TTF-1 (-) GATA-3(-) PAX8 (-)
Sítio primário	n	n	n	n
Pulmão n=12	0	0	10	2
Mama n=17	16	0	0	0
Ovário n=16	0	14	0	1
Estômago n=4	0	0	1	3
Peritônio n=3	0	3	0	0
Colo uterino n=3	0	2	0	1
Cólon n=2	0	0	0	2
Trato biliar n=1	0	0	0	1
Pâncreas n=1	0	0	0	1
Rim n=1	0	1	0	0

Os perfis de marcadores esperados para mama (GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (-)), para ovário (PAX8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (-)), para pulmão (TTF-1 (+), PAX8 (-) GATA-3 (-)) e trato gastrointestinal (PAX8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-)) foram observados em 88,23% (45/51) das amostras de mulheres com carcinomas destes sítios. Usando o TTF-1 como único marcador de sítio primário, 6,25% (3/48) dos carcinomas de outros sítios primários exceto pulmão foram incorretamente diagnosticados, com primários em mama (n=1), ovário (n=1) e estômago (n=1).

6. DISCUSSÃO

A utilização do painel de marcadores mais adequado permite sugerir o provável sítio primário do carcinoma nas efusões e excluir outros sítios possíveis, reduzindo os custos com imunocitoquímica. A escolha dos marcadores deve levar em consideração o sexo do paciente, a frequência dos sítios primários, o tipo de derrame (líquido pleural, peritoneal ou pericárdico), a sensibilidade e especificidade desses marcadores e os achados clínicos.

6.1. TIPO, FREQUÊNCIA E DIAGNÓSTICO DAS AMOSTRAS.

Refletindo o correto atendimento da demanda do SUS, foi obtido um bom número de casos de carcinoma metastáticos nos exames citopatológicos de efusões e lavados peritoneais em mulheres, permitindo a realização deste estudo.

O sítio primário de carcinoma mais comum foi o de pulmão, seguido dos carcinomas de mama e ovário. Quando são consideradas apenas as amostras de pacientes do sexo feminino, o sítio de carcinoma mais frequente foi mama, seguido de ovário. As amostras com carcinoma de sítios em mama e ovário corresponderam a 55% (33 de 60) do total de amostras, ou seja, a maioria das amostras com carcinomas em efusões e lavados peritoneais são de pacientes do sexo feminino. Em relação à distribuição dos sítios primários de acordo com os tipos de efusão/lavado peritoneal, o pulmão e a mama foram os sítios primários mais frequentes de carcinomas em líquidos pleurais; o ovário, o estômago e o peritônio em líquidos ascíticos; a mama em líquido pericárdico e o ovário em lavado peritoneal.

A elevada frequência de amostras de efusões e lavado peritoneal com carcinoma em pacientes do sexo feminino pode ser explicada pelo fato de que os carcinomas de mama e ovário estão entre os que mais frequentemente evoluem com metástases para cavidades. Um estudo unicêntrico da Universidade de Michigan mostra, de um universo de 1059 casos, o sexo feminino correspondendo a 64% das efusões pleurais e 67% das efusões peritoneais. (LEW *et al.*, 2020).

Lepus e Vivero em uma revisão meta-analítica, encontraram frequências de até 40% dos carcinomas de mama e 20% de ovário em efusões pleurais, contrastando com as efusões peritoneais, onde os mesmos tumores têm frequências de respectivamente 13% e 27%. Estes autores também inferem que estes achados não são devido ao acaso e sim consequência da

história natural destas doenças. (LEPUS; VIVERO, 2018).

Dentre os tumores metastáticos para o líquido pleural, o carcinoma ovariano é um pouco menos prevalente que o mamário. Um estudo de coorte do Reino Unido – o maior em língua inglesa até então - mostrou que 515 de 921 pacientes com derrames pleurais unilaterais foram positivos para malignidade à citopatologia convencional. Destes, 38 casos eram ovarianos e 58, mamários. (ARNOLD *et al.*, 2018)

Um trabalho unicêntrico do hospital Johns Hopkins, em Baltimore EUA (RODRIGUEZ; CHOWSILPA; MALEKI, 2018), mostrou que pulmão, mama e trato ginecológico são os tumores mais frequentemente metastáticos em efusões pleurais. De um total de 474 casos colhidos em 5 anos, foram diagnosticados 180 (37%) de carcinomas primários de pulmão, 81 da mama (17%) e 67 ginecológicos (13%). Este estudo prévio estudo mostra ainda que a maioria dos pacientes com carcinoma metastático em efusão pleural é do sexo feminino (61%). Estes achados também estão em paralelo aos achados na amostra em estudo.

Ressalta-se que há diversidade de achados entre alguns estudos. O estudo já citado de revisão mostra prevalência maior dos tumores ovarianos sobre os demais em efusões peritoneais, com 27% dos tumores de origem ovariana, 14% gástrica, 13% na mama, 11% pancreático e 10% colorretal (LEPUS; VIVERO, 2018). Entretanto um estudo recente mostra que de 418 cânceres estudados em líquido peritoneal, quando estudados em agrupamentos por sistemas abrangendo o sítio primário, os tumores oriundos do trato gastrointestinal superam os do trato genital feminino por pequena margem, respectivamente 35,8% e 35,4%, seguidos dos primários em mama com 10,4%. (LEW *et al.*, 2020). Neste estudo, quando pormenorizados os sítios primários por órgão, o ovário é o mais prevalente com 22,9% dos casos, seguido por pâncreas com 17%, mama com 10,4%, estômago com 5,7%, primário peritoneal com 5,0% e colorretal com 3,9%.

Os achados do presente estudo refletem, quanto ao tipo de amostra e respectivas frequências dos sítios primários de carcinomas, similaridades com os dados da literatura, o que reforça a validade do N amostral obtido.

6.2. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES RE E GATA-3 PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARCINOMA DE MAMA METASTÁTICO EM EFUSÕES

A expressão de GATA-3 foi observada em 100% das amostras com carcinoma de mama, com escore alto e significativamente maior que o do receptor de estrógeno RE. As amostras com carcinoma de outros sítios primários e as amostras benignas de efusão e de lavados peritoneais não apresentaram expressão. Dessa forma, a sensibilidade e a especificidade de GATA-3 para detecção de carcinoma em efusões e lavado peritoneal foram ambas 100%, o que é um achado ideal para marcadores diagnósticos. A literatura mostra em diversos trabalhos achados similares ao encontrado neste estudo para quase todos os tipos histológicos de carcinoma mamário, porém variável conforme o tipo molecular, pois há correlação entre a positividade para o GATA-3 e o receptor de estrógeno. Um estudo mostrou positividade em 95% de 166 tumores mamários testados. (SANGOI *et al.*, 2016). Em estudo similar, Clark e colaboradores acharam 95% de positividade em 186 carcinomas de mama, assim como em carcinomas uroteliais, que tem mesma positividade de 95% e escores de intensidade também comparáveis, utilizando-se escore semiquantitativo. Nos demais sítios, o estudo mostra, além da menor frequência de expressão variando de 2% a 18% em sítios como estômago, endométrio, ovário e pancreatobiliar, a imunoexpressão é mais fraca e focal. (CLARK *et al.*, 2014).

A expressão do GATA-3 é menor naqueles que são triplo-negativos – ou seja, cujo tumor primário é basal-símile, e não demonstra positividade para receptores de estrógeno, de progesterona e do produto do oncogene HER2. Mesmo assim, pesquisadores mostram bons resultados, o que tornam o marcador útil na determinação de sítio primário mesmo naqueles negativos aos demais marcadores, com positividade em 47% neste tipo de carcinoma mamário. (CIMINO-MATHEWS *et al.*, 2013b).

Deftereos e colaboradores mostram acurácia similar com 100% de sensibilidade e especificidade em biópsias mamárias de carcinomas não-triplo negativos, em um N amostral de 56 casos, sem diferença entre os tipos histológicos de carcinoma mamário. Entretanto, o mesmo estudo demonstrou a positividade da marcação em 17 de 28 tumores de mama triplo-negativos, e sugere que, caso usado em tumor metastático e negativo para este marcador, devem ser acrescidos outros aspectos morfológicos e outros marcadores para confirmação diagnóstica. Isto se deve ao fato que, por exemplo, quando GATA-3 é positivo e RE é negativo, o carcinoma urotelial deve ser excluído morfológicamente ou com auxílio de marcadores adicionais. Este

estudo prévio realizou também reação imunocitoquímica para GATA-3 em 20 casos de citopunção de metástases de carcinoma de mama, comparando-os a 12 carcinomas de endométrio e ovário, todos positivos ao receptor de estrógeno. E demonstrou igualmente 100% de positividade ao marcador GATA-3, sem resultado positivo nos demais tecidos, demonstrando que o perfil GATA-3+ e RE+ é preditivo para diferenciação mamária em metástases à citopunção. (DEFTEREOS *et al.*, 2015).

A sensibilidade de RE para detecção de carcinoma de mama em efusões foi mais baixa, de 47,05% e a especificidade de RE para detecção de carcinoma de mama em efusões foi de 92,98%. Isto se deve à expressão de RE em amostras de carcinoma com sítio primário em ovário, colo de útero e peritônio. Além disso, os escores são menores que os vistos na expressão do GATA-3, e dessa forma, a expressão de RE é menos prontamente identificável em amostras com celularidade baixa.

Além da expressão averiguada em tumores de outros sítios primários, a acurácia da expressão do receptor de estrógeno do carcinoma de mama varia conforme a heterogeneidade de expressão molecular do próprio carcinoma mamário.

Os carcinomas mamários abrigam grande heterogeneidade morfológica e de variabilidade molecular. A OMS atualmente classifica os carcinomas em diversos tipos histológicos. Há também a classificação molecular dos carcinomas mamários, que tem como principais variáveis os receptores hormonais de estrógeno e progesterona, além da superexpressão da oncoproteína HER2, do receptor para o hormônio de crescimento epitelial (EGFR) e de citoceratinas típicas de epitélios de camadas basais (CK5/6). (TAN *et al.*, 2020).

Comparativamente ao receptor de estrógeno, o GATA-3 foi mais sensível e específico para identificação de carcinoma de sítio primário de mama, e apresentou mediana de escore de positividade significativamente maior que RE. O escore mediano, mais alto, também tornam o marcador mais prontamente identificável como positivo à interpretação de quem faz a leitura da lâmina.

Estes achados são similares a um estudo norteamericano, que, utilizou de técnica de microarranjos em bloco celular, em material obtido de efusões com N amostral de 28 casos. O estudo mostrou expressão de GATA-3 em 89% dos carcinomas mamários examinados, com escore médio de 3,25 em escala de até 4, em comparação com a expressão de RE, que foi observada em 71% de das amostras, com escore de 2,95. (EL HAG, Mohamed I. *et al.*, 2016).

Assim, considerando os resultados obtidos, há similaridade com maior expressão e

maior escore para o GATA-3, mostrando-se superior ao RE para a determinação do provável sítio primário.

Neste estudo, os tipos de líquido com maior frequência de carcinoma de sítio primário em mama foram o líquido pleural e pericárdico. Considerando-se a frequência dos sítios primários de carcinoma em líquido pleural, o principal diagnóstico diferencial para o carcinoma de sítio primário em mama é o carcinoma de sítio primário em pulmão, segundo sítio mais frequente de carcinoma em líquido pleural em pacientes do sexo feminino. No presente estudo, nenhuma amostra de carcinoma de sítio primário em pulmão apresentou positividade para GATA-3 e RE. Este resultado indica que estes marcadores são específicos para definição do sítio primário em mama para carcinomas em líquidos pleurais e pericárdicos. Contudo, estudos prévios mostram que há um subgrupo de tumores primários de pulmão que pode expressar RE. A depender do clone do anticorpo utilizado, estudos mostram positividade imuno-histoquímica em porcentagens variadas e conflitantes. Um primeiro estudo americano mostrou negatividade dos 55 tumores testados com clone (1D5) mas 30% dos adenocarcinomas pulmonares foram positivos com clone 6F11 (DABBS *et al.*, 2002). Outro estudo também norte-americano mostra positividade em 18% de um universo de 55 tumores pulmonares. (LAU; CHU; WEISS, 2006). Estes achados não foram vistos em trabalho utilizando-se metodologia mais assemelhada à utilizada neste experimento, ou seja, em amostras de efusões. (LEE, Benjamin H. *et al.*, 2002).

Os carcinomas de sítio primário em estômago e cólon foram observados em líquidos pleurais e pericárdicos neste estudo e estão entre os mais frequentes nestes tipos de líquidos em estudos prévios. A ausência de expressão de GATA-3 em todas as amostras com carcinomas destas origens, observada no presente estudo, mostra que este marcador também auxilia na diferenciação entre os carcinomas de mama e carcinomas de origem gastrointestinal. Este achado é similar ao encontrado na literatura, com a imunomarcação do GATA-3 inexpressiva, fraca e restrita a 2% dos carcinomas gástricos testados em um estudo que a semiquantificou em diversos tumores por imuno-histoquímica (CLARK *et al.*, 2014). Estudo similar, com um total 2500 tumores, mostrou positividade em 2 em 142 adenocarcinomas colônicos, e 6 de 133 adenocarcinomas gástricos, em contraste à extensa expressão em carcinomas mamários, com 251 casos positivos dos 268 testados.

A positividade para GATA-3 também está descrita em mesoteliomas. Ordóñez e Sahin descreveram expressão de GATA-3 em 23% dos mesoteliomas, em 100% dos carcinomas mamários positivos para receptor de estrógeno, e em 30% dos negativos para este receptor.

(ORDÓÑEZ; SAHIN, 2014). Miettinen e colaboradores obtiveram achados ainda mais prevalentes, com positividade em 58% dos 64 mesoteliomas malignos testados por imunohistoquímica. (MIETTINEN *et al.*, 2014)

Igualmente, alguns mesoteliomas podem ter reações imuno-histoquímicas positivas para o receptor de estrógeno. Estudando mesoteliomas císticos benignos – um diagnóstico diferencial morfológico de vários tumores intraperitoneais, incluindo-se os metastáticos - Sawh observou positividade em apenas um dos 17 casos amostrados (SAWH *et al.*, 2003). Um estudo unicêntrico e retrospectivo mostrou positividade em 5% dos mesoteliomas peritoneais testados para este marcador. (TANDON *et al.*, 2018).

Neste estudo, nenhuma das amostras de carcinoma de mama apresentou expressão da calretinina, tampouco da proteína de teste relacionada ao mesotelioma, o HBME, o que reproduz achados da literatura e que estão em sintonia com a já citada revisão de comissão de especialistas, listando-a no painel sugerido para estudo de neoplasias de sítio indeterminado em cavidades. (KUSAMURA *et al.*, 2021).

O outro resultado relevante do presente estudo foi a ausência de expressão de GATA-3 e RE em células benignas encontradas em efusões e lavado peritoneal: mesoteliais benignas, macrófagos e leucócitos. Estas células, principalmente as células mesoteliais com alterações reativas e hiperplásicas podem ser confundidas com células epiteliais malignas. Além disto, sabe-se que marcadores de carcinomas como MOC-31 e BerEp-4 podem estar expressos em células mesoteliais benignas. (NASO; CHURG, 2020). Dessa forma a ausência de expressão de um marcador como GATA-3, cujo escore de positividade é muito elevado, ajuda a confirmar a falsa positividade para estes marcadores de carcinoma em casos específicos.

6.3. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MARCADORES PAX8, HBME E RE PARA IDENTIFICAÇÃO DE CARCINOMA DE SÍTIO PRIMÁRIO EM OVÁRIO EM EFUSÕES E LAVADO PERITONEAL.

A expressão de PAX8 mostrou-se amplamente positiva nas amostras de carcinoma ovariano, exceto em um único caso neste presente estudo. Sua sensibilidade para a detecção de carcinoma de ovário em efusões foi também muito alta, calculada em 93,75%, e a especificidade ainda maior, com 94,78%. Há ainda 6 casos positivos para tumores de outros

sítios, sendo todos os 3 carcinomas seroso primários do peritônio, dois de três carcinomas primários do colo uterino e um carcinoma de rim

Valores próximos a estes são encontrados na literatura em estudos que testaram material histopatológico e de citologia de efusões. Um estudo comparou o marcador com o antígeno WT-1 em microarranjos tissulares e imuno-histoquímica, para ver sua utilidade em diferenciar carcinomas mamários dos ovarianos (NONAKA; CHIRIBOGA; SOSLOW, 2008) e obteve em um universo amostral de 124 casos de carcinoma ovariano positividade geral de 87,1%, mas com perfis diferentes para cada subtipo tumoral. As porcentagens do PAX8 foram de 96,4% para carcinomas serosos, 88,9% dos endometrioides, e 100% para carcinomas de células claras, porém apenas de 8,3% em carcinomas mucinosos ovarianos, mostrando-se superior ao marcador WT-1 que obtinha respectivamente 86,9% para os serosos, 27,8% para os endometrioides, e nenhuma marcação para os de células claras e mucinosos, com expressão total em 62,9% dos carcinomas primários do ovário testados. Além disto, este mesmo estudo não obteve nenhuma positividade para o PAX8 e 2,8 % de positividade para o WT-1 em carcinomas mamários. Assim, os autores concluem que o PAX8 é um marcador superior ao WT-1 na diferenciação em carcinomas metastáticos entre os sítios primários da mama e do ovário. (NONAKA; CHIRIBOGA; SOSLOW, 2008). Achados similares, comparando tumores müllerianos e não-mülerianos, com 37 casos em cada braço do estudo, mostraram sensibilidade e especificidade respectivamente de 78 e 97% para distingui-los. (HEIDARPOUR; TAVANAFAR, 2014).

Os achados para PAX8 estão de acordo a outros dados encontrados na literatura. Tacha, Zhou e Cheng, em estudo com amostras histopatológicas em microarranjos, encontraram a positividade do marcador com sensibilidade alta em tumores ovarianos, seja em amostras do sítio primário (79%) ou amostras das metástases (97%). Houve também a positividade em percentual similar (90%) em carcinomas renais. Os carcinomas de colo uterino, entretanto, mostraram positividade geral de apenas 10%. Houve diferença na positividade do PAX8 dentre os tipos histológicos de carcinoma cervical, sendo positivo para 83% dos adenocarcinomas de colo uterino, mas apenas 2% dos carcinomas escamosos. Os autores, portanto, sugerem que o marcador tem boa sensibilidade e especificidade para discernir tumores ovarianos e renais. (TACHA; ZHOU; CHENG, 2011).

No presente estudo não foi encontrada a positividade do PAX8 em tumores primários da mama e do pulmão. Para a mama, estudos prévios mostram ser possível alguma positividade (KILGORE *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2021) e que os escores de positividade são baixos, mas que

há associação à não-expressão do receptor de estrógeno (LU *et al.*, 2021). Em recente meta-análise, a positividade para o PAX8 em carcinomas pulmonares foi considerada independentemente do tipo histológico. (JEONG; KIM; PYO, 2020). Portanto, a mera positividade para o PAX8 não é capaz de excluir o sítio primário pulmonar ou mamário.

Ao revisar a literatura, encontram-se achados similares quando testados em líquidos de efusões. Um estudo, mostrou que dentre 89 efusões pleurais e peritoneais obteve-se respectivamente 100% e 95% de especificidade para tumores de células renais e carcinomas de sítio mülleriano. (WATERS *et al.*, 2014). Porém, há um artigo onde cinco casos de um total de 41 mesoteliomas entre benignos e malignos, foram focais ou difusamente positivos para PAX8. Os autores sugerem, portanto, o uso de um painel com marcadores para excluir a diferenciação mesotelial. (CHAPEL *et al.*, 2017).

O HBME pode cumprir este papel. A expressão de HBME neste presente estudo foi observada em 14 dos 16 tumores ovarianos em efusões, porém também em sete casos pulmonares e 3 carcinomas serosos primários do peritônio, além de todas as efusões benignas. Assim, a sensibilidade é relativamente alta, com 87,5%, porém a especificidade para carcinoma ovariano, foi baixa, de 44,34%.

Este perfil foi similar ao identificado previamente em dados de literatura. Ascoli e colaboradores identificaram 83% de positividade do marcador em efusões de carcinomas primários de ovário (ASCOLI *et al.*, 1997); enquanto no estudo de Monacu, Cîmpean e Raica, a positividade foi de 66% (MOCANU; CÎMPEAN; RAICA, 2006).

O marcador, portanto, pode ser usado como auxiliar a depender do cenário diagnóstico do caso a ser estudado. A utilidade para diferenciar neoplasias benignas de malignas é limitada, porém, caso esta seja diagnosticada por outro marcador ou por características citomorfológicas, seu uso é excelente auxiliar na diferenciação de sítio primários ovariano ou mesotelial.

A expressão de RE neste estudo foi observada em proporção ainda menor que o HBME, com seis das 16 amostras com carcinoma de sítio primário em ovário (37,5%). Este achado é um pouco menor que o obtido em meta-análise em tumores primários realizada por Shen e colaboradores, onde observaram variação entre 41 e 83%. Neste meta-análise, a positividade ao RE foi associada a melhor prognóstico, fato que provavelmente explica menores índices nos tumores que expressam em efusões malignas. (SHEN, Zhaojun *et al.*, 2017).

Houve maior frequência de carcinoma de sítio primário em ovário no líquido ascítico e o lavado peritoneal em comparação aos achados nas efusões pleurais pode ser inferida pela contiguidade com o órgão de origem. Em líquidos ascíticos, os carcinomas de origem

gastrointestinal (estômago e cólon) também foram frequentes e são os principais diagnósticos diferenciais para os carcinomas de origem ovariana. No presente estudo, não houve marcação de PAX8 em carcinomas com origem em estômago ou em cólon, o que indica que este marcador é útil para a diferenciação entre carcinomas de origem ovariana e gastrointestinal. Este achado reforça a utilidade dos marcadores a depender do cenário diagnóstico encontrado, caso a caso. Tacha, Zhou e Cheng, na já citada extensa testagem imuno-histoquímica em tecidos de tumores de diversas topografias, não encontraram marcação para tumores colônicos e gástricos, fato também encontrado por Laury e colaboradores, em estudo imuno-histoquímico com amostras tumorais em microarranjos. Estes autores referiram apenas positividade ao PAX8 em subgrupo de amostras de adenocarcinomas do esôfago, e carcinomas primários de sítios biliar e pancreáticos. (LAURY *et al.*, 2011; TACHA; ZHOU; CHENG, 2011). Testando citologias de efusões e biópsias, um estudo afirma que o PAX8 é um marcador confiável no diagnóstico de tumores avançados de ovário e primários do peritônio, estendendo seu uso a biópsias e preparados citológicos em bloco celular – *cell block*, com apenas dois casos negativos de 53 testados, comparativamente apenas dois casos positivos em 43 carcinomas não-ovarianos. (MHAWECH-FAUCEGLIA *et al.*, 2012).

Quanto ao HMBE, um estudo em efusões mostrou positividade em todos os 74 mesoteliomas e todas as 48 efusões benignas testadas. Houve também positividade para 6 de 67 carcinomas em efusões pleurais e 30 de 125 carcinomas em efusões peritoneais. Destes, a maior parte era ovariana, ou pulmonar, mas houve marcação de 6 tumores gastrointestinais com efusões peritoneais, sendo cólon (1), estômago (4), e via biliar extra-hepática (1). (ASCOLI *et al.*, 1997).

A positividade de HBME em efusões benignas pode ser desafiadora em diagnóstico diferencial, principalmente se há doença inflamatória associada, pois nestas, os mesoteliócitos tendem a apresentar alterações reativas, que formam padrões de distribuição à citologia de efusões que podem mimetizar agrupamentos mais frequentemente vistos em neoplasias metastáticas. O estudo de revisão de Pereira e colaboradores mostra estes padrões morfológicos e coloca-os em um algoritmo diagnóstico, do qual uma das saídas é um painel diagnóstico, que à época, incluía vários marcadores para imunocitoquímica, incluindo-se o HBME. (PEREIRA. *et al.*, 2006). Lee e colaboradores também sugerem o uso de painel para diferenciar células mesoteliais reativas de mesotelioma – sugerindo dentre outros o antígeno carcinoembrionário. (LEE *et al.*, 2000).

6.4. O PAINEL IMUNOCITOQUÍMICO INICIAL E SEU ALGORITMO DIAGNÓSTICO.

A escolha de GATA-3 e PAX8 como marcadores de sítio primário de mama e ovário, respectivamente, foi baseada na alta sensibilidade e escores de positividade elevados desses marcadores em relação a outros marcadores como mamoglobina, GCDFP-15, receptor de estrogênio e WT1 (BRAXTON; COHEN; SIDDIQUI, 2015; DEFTEREOS *et al.*, 2015; EL HAG *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2012).

Quanto ao sítio primário de pulmão, não foi relatada diferença significativa na positividade da Napsina-A comparativamente ao TTF-1 como um único marcador em adenocarcinomas pulmonares metastáticos (KIM, Moon-Young *et al.*, 2014). A Napsina-A e o TTF-1 são marcadores úteis na distinção de adenocarcinoma pulmonar e extrapulmonar em efusões. Porém, a coloração nuclear do TTF-1 foi considerada de interpretação mais fácil do que a coloração citoplasmática de Napsina-A. (EL HAG *et al.*, 2016). O marcador TTF-1 possui vários clones e cada um tem sensibilidade e especificidade diferente. Artigos publicados mostram que o clone SPT24 é mais sensível, porém menos específico para a detecção de todos os adenocarcinomas de pulmão em comparação com o clone 8G7G3/1. (ALTREE-TACHA; TYRRELL; HAAS, 2017; GOWN, 2016). Não foi encontrada referência na literatura em estudo anterior que avaliasse a expressão do clone TTF-1 usado neste estudo em adenocarcinoma pulmonar metastático em efusões, mas sua sensibilidade foi maior do que a observada em um estudo anterior para o clone TTF-1 (8G7G3/1) e Napsina-A (EL HAG *et al.*, 2016).

Outro aspecto importante é a especificidade dos perfis. Apesar de que os marcadores utilizados (GATA-3, PAX8 e TTF-1) possam ser expressos nos mesoteliomas, não são normalmente expressos em células normais do mesotélio, as quais são comumente achadas em efusões e lavado peritoneal. Estas células têm características morfológicas similares e podem ser confundidas com células carcinomatosas (DEJMEK *et al.*, 2007; HUSAIN *et al.*, 2013; KLEBE *et al.*, 2016; ORDÓÑEZ, 2012; ORDÓÑEZ; SAHIN, 2014). O marcador WT-1, por sua vez, apesar de ser considerado de grande sensibilidade para tumores ovarianos, pode ser expresso tanto em células mesoteliais normais quanto nas dos mesoteliomas. (MCKNIGHT; COHEN; SIDDIQUI, 2010)

O presente estudo demonstrou que alguns perfis possuem alta sensibilidade e especificidade, e serão discutidos a seguir.

O perfil GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (-) para a detecção do carcinoma mamário mostrou sensibilidade elevada com 94,11% e especificidade de 100%. Todos os carcinomas de

sítio primário mamário foram positivos neste presente estudo. Este resultado está de acordo com estudo prévios, onde esta expressão de GATA-3 variou de 89% a 93,5% em efusões. (EL HAG, Mohamed I. *et al.*, 2017, 2016; ORDÓÑEZ; SAHIN, 2014)

Os carcinomas mamários foram identificados no líquido pleural e pericárdico, sendo que no líquido pleural, a mama foi o sítio primário mais comum, seguida pelo pulmão. No pericárdio, a expressão do TTF-1 foi encontrada em uma amostra de carcinoma de mama, resultando em um perfil com dois marcadores positivos, GATA-3 (+) e TTF-1 (+), e PAX8(-). Portanto, a sensibilidade do perfil GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (-) não foi de 100%. Em estudo anterior com 546 amostras histopatológicas de carcinoma de mama, apenas 2,4% apresentaram expressão de TTF-1, sendo o tipo histológico predominante nas amostras TTF-1 positivas o tipo não-especial (à data conhecido como ductal) (ROBENS *et al.*, 2010), sendo este também o tipo histológico encontrado no presente estudo. A especificidade do perfil GATA-3 (+), PAX8 (-) e TTF-1 (-), entretanto, foi de 100%, pois não houve expressão de GATA-3 em carcinomas de outras localizações. No entanto, em um estudo anterior, no qual muitos espécimes cirúrgicos com carcinoma de diferentes sítios primários foram analisados (n = 2500), a expressão de GATA-3 foi observada em carcinomas de sítios primários frequentemente encontrados em derrames como o pulmão (8%), ovário (6%) e estômago (5%) (MIETTINEN *et al.*, 2014). Como este resultado prévio indica que a positividade para GATA-3 não exclui completamente a possibilidade de carcinomas de outros locais primários em carcinomas metastáticos para efusões, o painel incluindo GATA-3, PAX8 e TTF-1 se mostra como uma forma de aumentar a especificidade.

O perfil de marcação PAX8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (-) obteve no presente estudo elevada sensibilidade (87,50%) e especificidade (86,36%) para o sítio primário ovariano. A sensibilidade deste perfil está concordante com resultados da literatura, nos quais a expressão de PAX8 variou de 70 a 100% em carcinomas ovarianos metastáticos em efusões. (TONG *et al.*, 2011; WATERS *et al.*, 2014; WISEMAN; MICHAEL; ROH, 2011).

O trato gastrointestinal, o segundo sítio de carcinoma mais frequente em amostras de líquido ascítico em mulheres, é o principal diagnóstico diferencial para carcinomas de origem ovariana. Salienta-se que a expressão de PAX8 não foi observada neste grupo de neoplasias, mesmo quando testados em amostras por microarranjos tissulares (*tissue microarray*) ou secções tissulares integrais de carcinomas colônicos e gástricos (LAURY *et al.*, 2011; TACHA; ZHOU; CHENG, 2011).

O perfil PAX8 (+), GATA-3 (-) e TTF-1 (-) não foi observado em duas amostras de

carcinoma primário do ovário. Em uma, não houve expressão do PAX8, resultando em perfil PAX8(-), GATA-3 (-) e TTF-1 (-); em outra, o PAX8 foi expresso, mas também TTF-1 e, portanto, o perfil gerado foi PAX8 (+), GATA-3 (-) e TTF-1(+).

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que a complementação imunocitoquímica pelo receptor de estrógeno e pelo HBME pode ser útil quando há o perfil PAX8 (-), GATA-3 (-) e TTF-1 (-). No presente estudo, o receptor de estrógeno foi observado em 37,5% dos tumores de origem ovariana, mas em nenhum primário do trato gastrointestinal. A expressão do HBME, entretanto, foi observada em 87,5% dos carcinomas ovarianos, mas em apenas 16,66% dos tumores gástricos. Em relação à expressão de TTF-1 no carcinoma de ovário, detectou-se em estudo anterior, em 17,7% e 3,2% dos carcinomas de ovário utilizando-se respectivamente os clones SPT24 e 8G7G3/1. (HAKIM; YOUSSEF, 2017).

A expressão do PAX8 não foi observada em sítios primários da mama e pulmão no presente estudo. Entretanto, estudos anteriores mostram que parte significativa dos carcinomas mamários mostram imunorreatividade para este marcador. (KILGORE *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2021). Em relação à expressão de PAX8 nos carcinomas pulmonares, um estudo meta-analítico mostrou que esta é rara e independente do subtipo tumoral. Portanto, a imunorreatividade isolada de PAX8 não exclui o carcinoma de origem mamária ou pulmonar. (JEONG; KIM; PYO, 2020).

Conforme esperado, o perfil PAX8 (+), GATA-3 (-) e TTF-1 (-) não é específico para carcinoma ovariano devido à expressão relativamente alta do mesmo em outros carcinomas do trato genital feminino e do rim. (LAURY *et al.*, 2010; TACHA; ZHOU; CHENG, 2011; TONG *et al.*, 2011). Neste presente estudo, a expressão de PAX8 foi observada em dois adenocarcinomas do colo uterino, e em um carcinoma renal. Carcinomas destes órgãos são infreqüentes em efusões e lavado peritoneal, porém marcadores apropriados devem ser incluídos para fim de diagnósticos diferenciais.

O perfil TTF-1 (+), PAX8 (-) e GATA-3 (-) mostrou-se de alta sensibilidade (83,33%) e especificidade (97,91%) para a detecção de carcinomas de pulmão. Resultados similares foram observados em meta-análise que avaliou a expressão de TTF-1 em carcinomas em efusões de 20 estudos diferentes, que resultou em sensibilidade de 74,5% e especificidade de 99% (SHEN, Yongchun *et al.*, 2016). A expressão de TTF-1 foi encontrada em adenocarcinomas pulmonares e carcinoma pulmonar de pequenas células com alta frequência, respectivamente em 96% e 89%, porém não foi detectada em carcinomas de células escamosas e carcinoma de grandes células. (NAKAMURA *et al.*, 2002) . No presente estudo, todos os

tumores primários do pulmão eram adenocarcinomas, exceto por um único carcinoma de células pequenas.

O perfil TTF-1 (-) PAX8 (-), e GATA-3 (-) foi observado em duas amostras de carcinoma pulmonar. Nestes casos, a literatura sugere a complementação com o uso da Napsina-A. O uso combinado com o TTF-1 resulta no aumento da sensibilidade e especificidade para adenocarcinomas pulmonares metastáticos. (YE *et al.*, 2011).

O perfil PAX8 (-), GATA-3 (-), e TTF-1 (-) mostrou-se com alta sensibilidade (83,33%) e especificidade (88,88%) dos carcinomas de trato gastrointestinal. O principal diagnóstico diferencial dos carcinomas metastáticos primários do trato gastrointestinal em mulheres são os de sítio ovariano, especialmente os mucinosos, nos quais o PAX8 é positivo em apenas 32% das amostras, são negativos para WT1 e podem ser positivos para CK20 e CDX-2, estes últimos tipificados como auxiliares nos diagnósticos de tumores primários colônicos (ACS; PASHA; ZHANG, 2004; ALDAOUD *et al.*, 2019). A expressão da citoceratina 20 (CK20) e do CDX-2 em microarranjos tissulares em parafina para carcinomas comumente observados em efusões e lavados peritoniais foram respectivamente: 88,6% e 93,3% nos colônicos; 24,6 e 46,9% nos gástricos, 5,6% e 2,8% nos pulmonares; 8,5% e 4,4% nos serosos ovarianos; 50% e 66,7% nos mucinosos ovarianos; e por fim, 2,7% e 0 nos carcinomas mamários (ALTREE-TACHA; TYRRELL; HAAS, 2017).

Em uma amostra de carcinoma gástrico, o perfil encontrado foi TTF-1 (+), PAX8 (-) e GATA-3(-). Em estudo prévio utilizando-se do clone mais sensível do TTF-1 (SPT24), a positividade alcançou 25% de todos os adenocarcinomas gástricos, sendo que 31% dos casos positivos para este clone também mostraram positividade, de forma citoplasmática granular e difusa, para Napsina-A. Entretanto, neste mesmo estudo, quando utilizado o clone menos sensível do TTF-1, o 8G7G3/1, apenas um dos casos positivos para o clone SPT24 foi positivo (CHOI; FURTH; ZHANG, 2016). Assim sendo, TTF-1 e Napsina-A igualmente não podem ser utilizados como evidência conclusiva para a origem pulmonar do carcinoma metastático, além de que há de se ponderar sobre qual clone do TTF-1 foi utilizado.

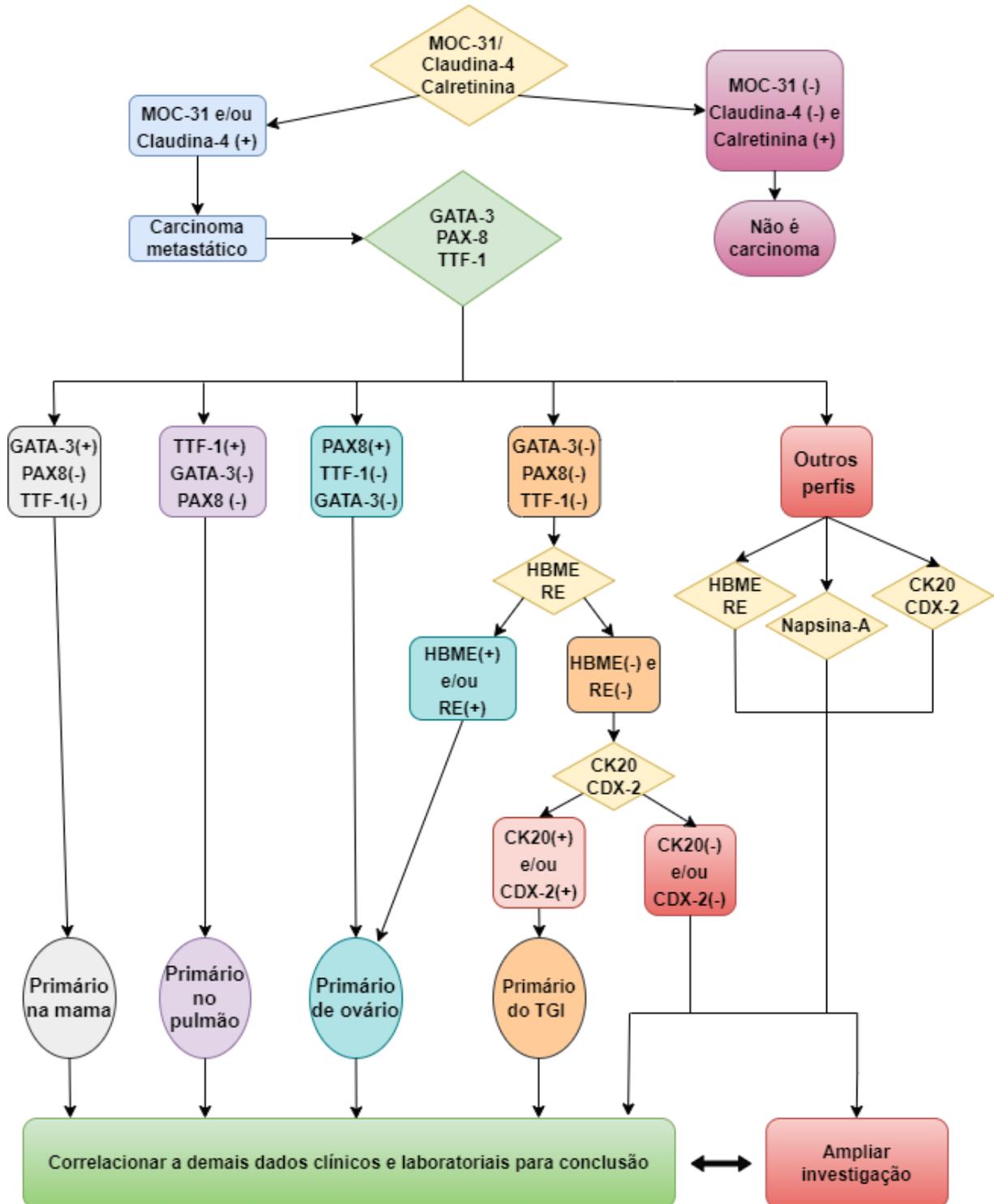
Utilizando-se de microarranjos tissulares de tecidos do pulmão comparando carcinomas primários e metastáticos, nos carcinomas primários de pulmão a frequência de expressão do TTF-1 foi de 90%, da Napsina-A 84%, do CDX-2 7% e do CK20 2%, enquanto nas metástases de carcinomas colorretais a expressão foi de 99% de CDX-2, 83% do CK20, 4% do TTF-1 e nenhum caso com expressão para Napsina-A (VIDARSDOTTIR *et al.*, 2019). Assim, dentre os carcinomas com perfil TTF-1 (-), PAX8 (-) e GATA-3 (-), a positividade para CK20 e / ou

CDX2 favorece o trato gastrointestinal como sítio primário em relação a outros sítios primários comuns (mama, ovário e pulmão). No entanto, esse padrão pode ser observado em carcinomas de localizações menos frequentes em cavidades como pancreática e do trato biliar, que, em alguns contextos clínicos, devem ser investigados mais detalhadamente.

O perfil esperado para carcinomas dos locais primários mais comuns, mama (GATA-3 (+), PAX8 (-), TTF-1 (-)), ovário (PAX8 (+), GATA-3 (-), TTF-1 (-)), pulmão (TTF-1 (+), PAX8 (-) GATA-3 (-)) e trato gastrointestinal (PAX8 (-), GATA-3 (-), TTF-1 (-)) foi observado na maioria das amostras de mulheres (88,23%) com carcinomas destes sítios primários. Este painel inicial, conseqüentemente, define o sítio primário mais provável e é capaz de excluir os demais sítios comuns com alta sensibilidade e especificidade. No entanto, é prudente considerar que os carcinomas em efusões e lavado peritoneal ainda podem surgir de sítios primários infrequentes, como útero e pâncreas/vias biliares, que podem ter perfis sobrepostos respectivamente a carcinomas ovarianos e do trato gastrointestinal. Além disto, o presente estudo demonstrou que, com expressões intensas e difusas, 6,25% dos carcinomas de outros locais primários seriam diagnosticados como carcinoma de pulmão se o TTF-1 fosse usado como o único marcador.

Estas ponderações quanto a utilização do painel inicial em efusões e lavado peritoneal, suas interações com ampliações e maior investigação clínica estão sumarizadas em algoritmo ilustrado pela na **Figura 18**.

Figura 18. Algoritmo inicial para marcadores imunocitoquímicos de efusões e lavado peritoneal em mulheres.



6.5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.

A principal limitação do estudo concerne à heterogeneidade dos fenótipos tumorais, em relação aos distintos sítios tumorais, mas também em cada sítio tumoral primário. A heterogeneidade indica que pode ser necessário, para fins de diagnóstico confirmatório, a testagem de mais de um marcador de alta especificidade para cada sítio tumoral, a fim de diagnóstico final acurado.

O marcador GATA-3 mostrou-se ideal, na amostra examinada, para diagnóstico de carcinoma de mama metastático para efusões, evidenciando a falta de heterogeneidade amostral. Encontrar, portanto, positividade tão alta na nossa amostragem significa provável aplicabilidade do marcador GATA-3 para citopatologia de efusões, portanto é resultado esperado, e mostra a aplicabilidade deste marcador para citologia de efusões e lavados peritoneais. A sensibilidade máxima que foi averiguada está certamente determinada pela amostragem relativamente pequena e na unicentricidade deste estudo. Assim, criticamente, é possível afirmar que a presente amostra é apenas parcialmente representativa do universo do estudo, pois não reflete a heterogeneidade conhecida dos carcinomas mamários.

Esta mesma heterogeneidade está associada a outra limitação do estudo que é ser unicêntrico e de N amostral relativamente modesto. Teoricamente, trabalhos multicêntricos e de N elevado são preferíveis para testes de hipóteses. (PEREIRA, Maurício Gomes, 2011). Hierarquicamente entre os trabalhos científicos, estudos unicêntricos tem nível de evidência menor, e seus resultados são menos transponíveis ao universo de pesquisa.

Entretanto, essa aparente fragilidade é também um diferencial, pois este trabalho que obteve diferenças significativas entre os marcadores, é capaz de indicar quais os melhores para os diagnósticos de carcinoma de mama e ovário dentre os testados nas amostras. Isto favorece a confirmação de achados de literatura mesmo sob as adversidades impostas neste momento histórico nas nossas condições locais.

À revisão bibliográfica, não há artigos multicêntricos em imunocitoquímica de efusões e lavados peritoneais, e assertivamente, tem-se neste ensaio um N similar a vários trabalhos da literatura médica citados previamente à discussão (DEKKER; BUPP, 1978; EDWARDS; OATES, 1995; KIM, Jo Heon *et al.*, 2010; LEW *et al.*, 2020; NAKAYAMA *et al.*, 2016; POMJANSKI *et al.*, 2005). Este presente estudo, portanto, não abriga disparidades significativas em relação à literatura consultada neste quesito.

Na nossa análise, a busca foi realizada com GATA-3 e RE ou HMBE e PAX8, auxiliada pelo TTF-1 e marcadores de exclusão de carcinoma metastático. Muitos outros marcadores não puderam ser testados, por motivos de logística e financiamento. Para refinamento do estudo, seria desejável, dentre outros, o teste de marcadores para carcinoma de pulmão, trato gastrointestinal, e ovário. Como exemplo, seria desejável ter a disposição a Napsina-A, marcador citoplasmático expresso em adenocarcinomas pulmonares, que reforçaria a confirmação do sítio primário pulmonar, tendo em vista que alguns tumores pulmonares podem muito raramente expressar GATA-3 (TURNER *et al.*, 2012; ZHAO, Lianhua *et al.*, 2019). Marcadores úteis para tumores gastrointestinais, como o SATB2 e o CDX-2 seriam também de grande valia para confirmação destes sítios (DABIR; SVANHOLM; CHRISTIANSEN, 2018); marcadores úteis para a exclusão de tumores ovarianos como os citados em recente estudo - Uroplaquina II, SOX2, e SALL4 (REN; KLUMP, 2019).

Outra situação desejável é a dupla marcação de antígenos em uma mesma lâmina citopatológica. Dois marcadores – um de membrana ou citoplasmático e outro nuclear – podem potencializar o entendimento da imunoexpressão dos antígenos na mesma célula e classificá-la com mais propriedade, sem a necessidade de repetições de lâminas, minimizando o gasto do material e dobrando as possibilidades de testagem da amostra. (AVIVI; ROSEN; GOLDSTEIN, 1994). A dupla marcação é ainda mais útil em imunocitoquímica pois facilita, ao possibilitar a visualização de dois marcadores em uma mesma célula, a determinação de sua histogênese, mas também a utilização de marcadores antagônicos para células que formam grupamentos citomorfológicos similares, diferindo-as na mesma lâmina, e assim possibilitando melhor diagnóstico diferencial (SHIDHAM; VARSEGI; D'AMORE, 2010).

A técnica vem sendo refinada com o tempo, e mostra-se de grande futuro frente às técnicas de aquisição e interpretação digital de imagem. Os escores obtidos de maneira semiquantitativa por leitura da lâmina histológica por um observador podem ser substituídos por valores paramétricos com auxílio de captura digital da imagem e leitura por software, aumentando as possibilidades interpretativas destes valores (VAN DER LOOS, 2010).

Similarmente, a aquisição digital de imagens e sua interpretação por algoritmo digital são campos de estudo amplos, os quais necessitam de equipamentos, software e treinamento distintos do escopo do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

GATA-3 e PAX8, como marcadores imunocitoquímicos e na técnica utilizada, apresentam elevada acurácia e escore de positividade para identificação de sítio primário de mama e ovário, respectivamente, em carcinoma de efusões e lavados peritoneais.

Os marcadores HBME e RE não possuem acurácia elevada, porém em cenários específicos podem contribuir no algoritmo para identificação do sítio primário de carcinoma em efusões/lavado peritoneal, principalmente para identificação de sítio primário em ovário.

Os marcadores do painel inicial não foram expressos em células mesoteliais benignas, que são frequentemente encontradas nestes tipos de amostra e podem ser morfológicamente confundidas com células de carcinoma. Este resultado sugere uma alta especificidade destes marcadores para amostras malignas e, dessa forma, diminui a probabilidade de falso-positividade por erros de interpretação morfológica.

O painel inicial incluindo GATA-3, PAX8 e TTF-1 possibilita, com elevada sensibilidade e especificidade, a identificação dos sítios primários mais prováveis e exclusão de outros sítios mais frequentes de carcinomas em efusões e lavado peritoneal em mulheres. Os resultados obtidos ressaltam a importância do uso de painel de marcadores imunocitoquímicos a fim de evitar a identificação incorreta de sítios primários em efusões e lavados peritoneais malignos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS, G.; PASHA, T.; ZHANG, P. J. WT1 is Differentially Expressed in Serous, Endometrioid, Clear Cell, and Mucinous Carcinomas of the Peritoneum, Fallopian Tube, Ovary, and Endometrium. **International Journal of Gynecological Pathology**, vol. 23, no. 2, p. 110–118, Apr. 2004. <https://doi.org/10.1097/00004347-200404000-00004>.

ALDAOUD, N.; ERASHDI, M.; ALKHATIB, S.; ABDO, N.; AL-MOHTASEB, A.; GRABOSKI-BAUER, A. The utility of PAX8 and SATB2 immunohistochemical stains in distinguishing ovarian mucinous neoplasms from colonic and appendiceal mucinous neoplasm. **BMC Research Notes**, vol. 12, no. 1, p. 770, 26 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4816-9>.

ALTREE-TACHA, D.; TYRRELL, J.; HAAS, T. CDH17 Is a More Sensitive Marker for Gastric Adenocarcinoma Than CK20 and CDX2. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 141, no. 1, p. 144–150, 1 Jan. 2017. <https://doi.org/10.5858/arpa.2015-0404-OA>.

ARNOLD, D. T.; FONSEKA, D. De; PERRY, S.; MORLEY, A.; HARVEY, J. E.; MEDFORD, A.; BRETT, M.; MASKELL, N. A. Investigating unilateral pleural effusions: The role of cytology. **European Respiratory Journal**, vol. 52, no. 5, p. 1–9, 2018. <https://doi.org/10.1183/13993003.01254-2018>.

ASCH-KENDRICK, R.; CIMINO-MATHEWS, A. The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. **Human Pathology**, vol. 48, p. 37–47, Feb. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.035>.

ASCOLI, V.; CARNOVALE-SCALZO, C.; TACCOGNA, S.; NARDI, F. Utility of HBME-1 immunostaining in serous effusions. **Cytopathology**, vol. 8, no. 5, p. 328–335, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.1997.tb00557.x>.

ATHANASSIADOU, P.; GONIDI, M.; LIOSSI, A.; PETRAKAKOU, E.; NAKOPOULOU, L.; ZERVA, C.; ATHANASSIADES, P. Moc-31, fibronectin and CEA in the differential diagnosis of malignant effusions: An immunocytochemical study. **Pathology and Oncology Research**, vol. 6, no. 2, p. 100–103, 2000. <https://doi.org/10.1007/BF03032357>.

ATTANOOS, R. L.; GODDARD, H.; GIBBS, A. R. Mesothelioma-binding antibodies: Thrombomodulin, OV 632 and HBME-1 and their use in the diagnosis of malignant mesothelioma. **Histopathology**, vol. 29, no. 3, p. 209–215, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1996.tb01393.x>.

AVIVI, C.; ROSEN, O.; GOLDSTEIN, R. S. New chromogens for alkaline phosphatase histochemistry: Salmon and magenta phosphate are useful for single- and double-label immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, vol. 42, no. 4, p. 551–554, 1994. <https://doi.org/10.1177/42.4.8126379>.

BAIZAR, M.; WINTER, M. J.; DE BOER, C. J.; LITVINOV, S. V. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). **Journal of Molecular Medicine**, vol. 77, no. 10, p. 699–712, 1999. <https://doi.org/10.1007/s001099900038>.

BRAXTON, D. R.; COHEN, C.; SIDDIQUI, M. T. Utility of GATA3 immunohistochemistry for diagnosis of metastatic breast carcinoma in cytology specimens. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 43, no. 4, p. 271–277, Apr. 2015. DOI 10.1002/dc.23206. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.23206>.

BURRY, R. W. Controls for Immunocytochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, vol. 59, no. 1, p. 6–12, 23 Jan. 2011. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956920>.

CARNEIRO, F.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.; CARNEIRO, M.; OLIVEIRA, sis; SOARES, A.; HAAR, N.; TAKANO, G.; VIANNA, L.; CALDAS, G.; VIEIRA, D.; FRUTUOSO, L.; BRITO, L.; DE SIQUEIRA, R.; PARENTE, A.; DE CASTRO, T.; PERES, I.; MENDES, L.; BORGES, T.; FERREIRA, V.; MOTOYAMA, A. Anti-EpCAM antibodies for detection of metastatic carcinoma in effusions and peritoneal wash. **Oncology Letters**, vol. 18, no. 2, p. 2019–2024, 12 Jun. 2019. DOI 10.3892/ol.2019.10468. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10468>.

CASTRO, T.; CARNEIRO, M.; FERREIRA, V.; MOTOYAMA, A.; CARNEIRO, F. Aplicação do Método “Plasma-Tromboplastina/ Trombina” no Preparo de Amostras Citológicas para Pesquisa de Câncer no Laboratório de Anatomia Patológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, vol. 20, no. 1, p. 85–90, 2016. DOI 10.4034/RBCS.2016.20.01.12. Available at: <http://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/rbcs/article/view/27002/15227>.

CHAPEL, D. B.; HUSAIN, A. N.; KRAUSZ, T.; MCGREGOR, S. M. PAX8 Expression in a Subset of Malignant Peritoneal Mesotheliomas and Benign Mesothelium has Diagnostic Implications in the Differential Diagnosis of Ovarian Serous Carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, vol. 41, no. 12, p. 1675–1682, 2017. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000935>.

CHEN, Y.; BATES, D. L.; DEY, R.; CHEN, P. H.; MACHADO, A. C. D.; LAIRD-OFFRINGA, I. A.; ROHS, R.; CHEN, L. DNA Binding by GATA Transcription Factor Suggests Mechanisms of DNA Looping and Long-Range Gene Regulation. **Cell Reports**, vol. 2, no. 5, p. 1197–1206, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.012>.

CHHIENG, D. C.; YEE, H.; SCHAEFER, D.; CANGIARELLA, J. F.; JAGIRDAR, J.; CHIRIBOGA, L. A.; COHEN, J. M. Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. **Cancer**, vol. 90, no. 3, p. 194–200, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20000625\)90:3<194::AID-CNCR8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20000625)90:3<194::AID-CNCR8>3.0.CO;2-K).

CHOI, S. M.; FURTH, E. E.; ZHANG, P. J. Unexpected TTF-1 Positivity in a Subset of Gastric Adenocarcinomas. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 24, no. 8, p. 603–607, Sep. 2016. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000244>.

CIMINO-MATHEWS, A.; SUBHAWONG, A. P.; ILLEI, P. B.; SHARMA, R.; HALUSHKA, M. K.; VANG, R.; FETTING, J. H.; PARK, B. H.; ARGANI, P. GATA3 expression in breast carcinoma: Utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas. **Human Pathology**, vol. 44, no. 7, p. 1341–1349, 2013a. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.11.003>.

CIMINO-MATHEWS, A.; SUBHAWONG, A. P.; ILLEI, P. B.; SHARMA, R.; HALUSHKA, M. K.; VANG, R.; FETTING, J. H.; PARK, B. H.; ARGANI, P. GATA3 expression in breast carcinoma: Utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas. **Human Pathology**, vol. 44, no. 7, p. 1341–1349, 2013b. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.11.003>.

CLARK, B. Z.; BERIWAL, S.; DABBS, D. J.; BHARGAVA, R. Semiquantitative GATA-3 immunoreactivity in breast, bladder, gynecologic tract, and other cytokeratin 7-positive carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 142, no. 1, p. 64–71, 2014. <https://doi.org/10.1309/AJCP8H2VBDSCIOBF>.

CONNER, J. R.; HORNICK, J. L. Metastatic Carcinoma of Unknown Primary: Diagnostic Approach Using Immunohistochemistry. **Adv Anat Pathol**, vol. 22, p. 149–167, 2015. .

DABBS, D. J. **Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications**. 5th ed. Pittsburg: Elsevier, 2018.

DABBS, D. J.; LANDRENEAU, R. J.; LIU, Y.; RAAB, S. S.; MALEY, R. H.; TUNG, M. Y.; SILVERMAN, J. F. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. **Annals of Thoracic Surgery**, vol. 73, no. 2, p. 403–406, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)03358-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)03358-6).

DABIR, P. D.; SVANHOLM, H.; CHRISTIANSEN, J. J. SATB2 is a supplementary immunohistochemical marker to CDX2 in the diagnosis of colorectal carcinoma metastasis in an unknown primary. **Apmis**, vol. 126, no. 6, p. 494–500, 2018. <https://doi.org/10.1111/apm.12854>.

DAVIDSON, B. Malignant effusions: From diagnosis to biology. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 31, no. 4, p. 246–254, 2004. <https://doi.org/10.1002/dc.20133>.

DE LARA, S.; PARRIS, T. Z.; WERNER RÖNNERMAN, E.; HELOU, K.; KOVÁCS, A. GATA3 as a putative marker of breast cancer metastasis—A retrospective immunohistochemical study. **Breast Journal**, vol. 24, no. 2, p. 184–188, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1111/tbj.12863>.

DE MATOS, P. S.; FERREIRA, A. P.; DE OLIVEIRA FACURI, F.; ASSUMPÇÃO, L. V. M. M.; METZE, K.; WARD, L. S. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. **Histopathology**, vol. 47, no. 4, p. 391–401, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02221.x>.

DEFTEREOS, G.; RAMIREZ, A. M. S.; SILVERMAN, J. F.; KRISHNAMURTI, U. GATA3 immunohistochemistry expression in histologic subtypes of primary breast carcinoma and metastatic breast carcinoma cytology. **American Journal of Surgical Pathology**, vol. 39, no. 9, p. 1282–1289, 2015. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000505>.

DEJMEK, A.; NAUCLER, P.; SMEDJEBACK, A.; KATO, H.; MAEDA, M.; YASHIMA, K.; MAEDA, J.; HIRANO, T. Napsin A (TA02) is a useful alternative to thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for the identification of pulmonary adenocarcinoma cells in pleural effusions.

Diagnostic Cytopathology, vol. 35, no. 8, p. 493–497, Aug. 2007. <https://doi.org/10.1002/dc.20667>.

DEKKER, P. A.; BUPP, P. A. Cytology of serous effusions. An investigation into the usefulness of cell blocks versus smears. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 70, no. 6, p. 855–860, 1978. <https://doi.org/10.1093/ajcp/70.6.855>.

DEMAY, R. Mac. **The Art & Science of Cytopathology**. 2nd ed. Bethesda: American Society for Clinical Pathology, 2011.

DI PALMA, T.; FILIPPONE, M. G.; PIERANTONI, G. M.; FUSCO, A.; SODDU, S.; ZANNINI, M. Pax8 has a critical role in epithelial cell survival and proliferation. **Cell Death and Disease**, vol. 4, no. 7, p. e729-8, 2013. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.262>.

DIAZ, L. K.; SNEIGE, N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: Current issues and keys to increasing testing accuracy. **Advances in Anatomic Pathology**, vol. 12, no. 1, p. 10–19, 2005. <https://doi.org/10.1097/00125480-200501000-00003>.

DOGLIONI, C.; DEI, A. P.; LAURINO, L.; IUZZOLINO, P.; CHIARELLI, C.; CELIO, M. R.; VIALE, G. Calretinin: A Novel Immunocytochemical Marker for Mesothelioma. **The American Journal of Surgical Pathology**, vol. 20, no. 9, p. 1037–1046, Sep. 1996. <https://doi.org/10.1097/00000478-199609000-00001>.

DOUGLAS, G. An Audit of the Clinical Investigation of pleural effusion. **Thorax**, vol. 47, p. 734–737, 1992. .

DOXTADER, E. E.; CHUTE, D. J. Evaluation of Carcinoma of Unknown Primary on Cytologic Specimens. **Surgical Pathology Clinics**, vol. 11, no. 3, p. 545–562, 2018. DOI 10.1016/j.path.2018.04.006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.path.2018.04.006>.

EDWARDS, C.; OATES, J. OV 632 and MOC 31 in the diagnosis of mesothelioma and adenocarcinoma: An assessment of their use in formalin fixed and paraffin wax embedded material. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 48, no. 7, p. 626–630, 1995. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.7.626>.

EL HAG, M. I.; HA, J.; FARAG, R.; EL HAG, A. M.; MICHAEL, C. W. Utility of GATA-3 in the work-Up of breast adenocarcinoma and its differential diagnosis in serous effusions:

Diagnostic Cytopathology, vol. 44, no. 9, p. 731–736, Sep. 2016. DOI 10.1002/dc.23521. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.23521>.

EL HAG, M. I.; HAG, A. M.; HA, J. P.; MICHAEL, C. W. Comparison of GATA-3, mammaglobin, GCDFP-15 expression in breast carcinoma in serous effusions: A cell-block micro-array study. **Pleura and Peritoneum**, vol. 2, no. 3, p. 143–148, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1515/pp-2017-0014>.

EL HAG, M.; SCHMIDT, L.; ROH, M.; MICHAEL, C. W. Utility of TTF-1 and Napsin-A in the work-up of malignant effusions. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 44, no. 4, p. 299–304, 1 Apr. 2016. <https://doi.org/10.1002/dc.23442>.

ELSHEIKH, T. M.; SILVERMAN, J. F. Fine needle aspiration and core needle biopsy of metastatic malignancy of unknown primary site. **Modern Pathology**, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0149-9>.

ENGEL, K. B.; MOORE, H. M. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed , Paraffin-Embedded Tissue. vol. 135, no. May, 2011. .

ENGELS, M.; MICHAEL, C.; DOBRA, K.; HJERPE, A.; FASSINA, A.; FIRAT, P. Management of cytological material, pre-analytical procedures and bio-banking in effusion cytopathology. **Cytopathology**, vol. 30, no. 1, p. 31–38, 2019. <https://doi.org/10.1111/cyt.12654>.

FABBRO, D.; DI LORETO, C.; STAMERRA, O.; ALBERTO BELTRAMI, C.; LONIGRO, R.; DAMANTE, G. TTF-1 gene expression in human lung tumours. **European Journal of Cancer**, vol. 32, no. 3, p. 512–517, 1996. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00560-9](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00560-9).

FETSCH, P. A.; ABATI, A.; HIJAZI, Y. M. Utility of the antibodies CA 19-9, HBME-1, and thrombomodulin in the diagnosis of malignant mesothelioma and adenocarcinoma in cytology. **Cancer**, vol. 84, no. 2, p. 101–108, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19980425\)84:2<101::AID-CNCR6>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19980425)84:2<101::AID-CNCR6>3.0.CO;2-S).

FETSCH, P. A.; SIMSIR, A.; BROSKY, K.; ABATI, A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 26, no. 1, p. 61–66, 2002. <https://doi.org/10.1002/dc.10039>.

FRANCIS, I. M.; ALATH, P.; GEORGE, S. S.; JARAGH, M.; AL JASSAR, A.; KAPILA, K. Metastatic breast carcinoma in pleural fluid: Correlation of receptor and HER2 status with the primary carcinoma-a pilot study. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 44, no. 12, p. 980–986, Dec. 2016. <https://doi.org/10.1002/dc.23607>.

GOWN, A. M. Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent It. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 140, no. 9, p. 893–898, 1 Sep. 2016. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0119-RA>.

GRIEBEL, A.; KONRAD, R.; RINK, S.; KARLSEN, F. Original Report. no. September, p. 1–5, 2000. .

HAKIM, S. A.; YOUSSEF, N. S. Diagnostic Utility of Thyroid Transcription Factor-1 in Ovarian Carcinoma and Its Relationship With Clinicopathologic Prognostic Parameters. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 25, no. 4, p. 237–243, Apr. 2017. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000301>.

HARVEY, J. M.; CLARK, G. M.; OSBOURNE, K.; ALLRED, D. C. Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. **J Clin Oncol**, vol. 17, no. 5, p. 1474–1481, 1999. .

HEIDARPOUR, M.; TAVANAFAR, Z. Diagnostic utility of PAX8 in differentiation of mullerian from non-mullerian tumors. **Advanced biomedical research**, vol. 3, p. 96, 2014. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.129366>.

HEISE, A.; PAULA, A.; LIMA, W. CITOPATOLOGIA CONVENCIONAL E CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA CONVENTIONAL CYTOPATHOLOGY AND LIQUID BASED CYTOLOGY: AN INTEGRATIVE REVIEW. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, vol. 10, no. 5, p. 208–221, 2016. .

HUSAIN, A. N.; COLBY, T.; ORDONEZ, N.; KRAUSZ, T.; ATTANOOS, R.; BEASLEY, M. B.; BORCZUK, A. C.; BUTNOR, K.; CAGLE, P. T.; CHIRIEAC, L. R.; CHURG, A.; DACIC, S.; FRAIRE, A.; GALATEAU-SALLE, F.; GIBBS, A.; GOWN, A.; HAMMAR, S.; LITZKY, L.; MARCHEVSKY, A. M.; ... WICK, M. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma: 2012 Update of the Consensus Statement from the International

Mesothelioma Interest Group. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 137, no. 5, p. 647–667, May 2013. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0214-OA>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasi**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019**. [S. l.: s. n.], 2018. vol. 1, . <https://doi.org/978-85-7318-194-4>.

JEONG, J. H.; KIM, N. Y.; PYO, J.-S. Analysis of PAX8 immunohistochemistry in lung cancers: a meta-analysis. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, vol. 54, no. 4, p. 300–309, 15 Jul. 2020. <https://doi.org/10.4132/jptm.2020.06.08>.

JING, X.; LI, Q. K.; BEDROSSIAN, U.; MICHAEL, C. W. Morphologic and immunocytochemical performances of effusion cell blocks prepared using 3 different methods. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 139, no. 2, p. 177–182, 2013. <https://doi.org/10.1309/AJCP83ADULCXMAIX>.

JOHANSSON, L. Histopathologic classification of lung cancer: Relevance of cytokeratin and TTF-1 immunophenotyping. **Annals of Diagnostic Pathology**, vol. 8, no. 5, p. 259–267, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2004.07.001>.

KHAN, S.; OMAR, T.; MICHELOW, P. Effectiveness of the cell block technique in diagnostic cytopathology. **Journal of cytology**, vol. 29, no. 3, p. 177–82, Jul. 2012. <https://doi.org/10.4103/0970-9371.101167>.

KILGORE, M. R.; BOSCH, D. E.; ADAMSON, K. H.; SWANSON, P. E.; DINTZIS, S. M.; RENDI, M. H. Unexpected PAX8 Immunoreactivity in Metastatic High-grade Breast Cancer. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 27, no. 9, p. 637–643, Oct. 2019. DOI 10.1097/PAI.0000000000000707. Available at: <https://journals.lww.com/10.1097/PAI.0000000000000707>.

KIM, J. H.; CHOI, Y. D.; LEE, J. S. J. H.; LEE, J. S. J. H.; NAM, J. H.; CHOI, C. Utility of thyroid transcription factor-1 and CDX-2 in determining the primary site of metastatic adenocarcinomas in serous effusions. **Acta Cytologica**, vol. 54, no. 3, p. 277–282, 2010. <https://doi.org/10.1159/000325035>.

KIM, M.-Y.; GO, H.; KOH, J.; LEE, K.; MIN, H.-S.; KIM, M.-A.; JEON, Y. K.; LEE, H.-S.; MOON, K.-C.; PARK, S. Y.; KIM, W.-H.; CHUNG, D. H. Napsin A is a useful marker for metastatic adenocarcinomas of pulmonary origin. **Histopathology**, vol. 65, no. 2, p. 195–206, Aug. 2014. <https://doi.org/10.1111/his.12383>.

KLEBE, S.; SWALLING, A.; JONAVICIUS, L.; HENDERSON, D. W. An immunohistochemical comparison of two TTF-1 monoclonal antibodies in atypical squamous lesions and sarcomatoid carcinoma of the lung, and pleural malignant mesothelioma. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 69, no. 2, p. 136–141, 1 Feb. 2016. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203184>.

KLINGEN, T. A.; CHEN, Y.; GUNDERSEN, M. D.; AAS, H.; WESTRE, B.; SAUER, T. Thyroid transcription factor-1 positive primary breast cancer: a case report with review of the literature. **Diagnostic Pathology**, vol. 5, no. 1, p. 37, 17 Dec. 2010. DOI 10.1186/1746-1596-5-37. Available at: <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1596-5-37>.

KNIGHT, W. A.; LIVINGSTON, R. B.; GREGORY, E. J.; MCGUIRE, W. L. Estrogen Receptor as an Independent Prognostic Factor for Early Recurrence in Breast Cancer. **Cancer Research**, vol. 37, no. 12, p. 4669–4671, 1977. .

KOSS, L. G.; MELAMED, M. R. **Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases**. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

KUMAR, V.; GREEN, S.; STACK, G.; BERRY, M.; JIN, J.-R.; CHAMBON, P. Functional domains of the human estrogen receptor. **Cell**, vol. 51, p. 941–951, Mar. 1987. .

KUSAMURA, S.; KEPENEKIAN, V.; VILLENEUVE, L.; LURVINK, R. J.; GOVAERTS, K.; DE HINGH, I. H. J. T.; MORAN, B. J.; VAN DER SPEETEN, K.; DERACO, M.; GLEHEN, O.; BARRIOS-SANCHEZ, P.; BAUMGARTNER, J. M.; BEN-YAACOV, A.; BERTULLI, R.; CASHIN, P.; CECIL, T.; DAYAL, S.; DE SIMONE, M.; FOSTER, J. M.; ... YU, Y. Peritoneal mesothelioma: PSOGI/EURACAN clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **European Journal of Surgical Oncology**, vol. 47, no. 1, p. 36–59, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.02.011>.

LAL-NAG, M.; MORIN, P. J. The claudins. **Genome Biology**, vol. 10, no. 8, p. 235, 2009.

DOI 10.1186/gb-2009-10-8-235. Available at:
<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2009-10-8-235>.

LAU, S. K.; CHU, P. G.; WEISS, L. M. Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor in Pulmonary Adenocarcinoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 14, no. 1, p. 83–87, Mar. 2006. <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000168593.35850.9c>.

LAU, S. K.; LUTHRINGER, D. J.; EISEN, R. N. Thyroid Transcription Factor-1: A Review. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 10, no. 2, p. 97–102, 2002. <https://doi.org/10.1097/00129039-200206000-00001>.

LAURY, A. R.; HORNICK, J. L.; PERETS, R.; KRANE, J. F.; CORSON, J.; DRAPKIN, R.; HIRSCH, M. S. PAX8 reliably distinguishes ovarian serous tumors from malignant mesothelioma. **American Journal of Surgical Pathology**, vol. 34, no. 5, p. 627–635, 2010. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181da7687>.

LAURY, A. R.; PERETS, R.; PIAO, H.; KRANE, J. F.; BARLETTA, J. A.; FRENCH, C.; CHIRIEAC, L. R.; LIS, R.; LODA, M.; HORNICK, J. L.; DRAPKIN, R.; HIRSCH, M. S. A comprehensive analysis of PAX8 expression in human epithelial tumors. **American Journal of Surgical Pathology**, vol. 35, no. 6, p. 816–826, 2011. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318216c112>.

LEAKE, R.; BARNES, D.; PINDER, S.; ELLIS, I.; ANDERSON, L.; ANDERSON, T.; ADAMSON, R.; RHODES, T.; MILLER, K.; WALKER, R. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. UK Receptor Group, UK NEQAS, The Scottish Breast Cancer Pathology Group, and The Receptor and Biomarker Study Group of the EORTC. **J Clin Pathol**, vol. 53, no. 8, p. 634–635, 2000. .

LEE, A.; BALOCH, Z. W.; YU, G.; GUPTA, P. K. Mesothelial hyperplasia with reactive atypia: Diagnostic pitfalls and role of immunohistochemical studies - A case report. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 22, no. 2, p. 113–116, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0339\(200002\)22:2<113::AID-DC12>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0339(200002)22:2<113::AID-DC12>3.0.CO;2-6).

LEE, B. H.; HECHT, J. L.; PINKUS, J. L.; PINKUS, G. S. WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic

adenocarcinoma to body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 117, no. 5, p. 745–750, 2002. <https://doi.org/10.1309/QLV6-HH0H-UCTF-WEF6>.

LEPUS, C. M.; VIVERO, M. Updates in Effusion Cytology. **Surgical Pathology Clinics**, vol. 11, no. 3, p. 523–544, Sep. 2018. DOI 10.1016/j.path.2018.05.003. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875918118300357>.

LEW, M.; CANTLEY, R.; HEIDER, A.; JING, X. Diagnosis and categorization of malignant effusions: A 6-year review from a single academic institution. **Diagnostic Cytopathology**, no. January, p. 1–7, 2020. <https://doi.org/10.1002/dc.24433>.

LEW, M.; PANG, J. C.; JING, X.; FIELDS, K. L.; ROH, M. H. Young investigator challenge: The utility of GATA3 immunohistochemistry in the evaluation of metastatic breast carcinomas in malignant effusions. **Cancer Cytopathology**, vol. 123, no. 10, p. 576–581, 2015. <https://doi.org/10.1002/cncy.21574>.

LI, M.; ZHAO, L.; ZHOU, X.; ZHANG, K.; YIN, P.; LIU, S.; ZOU, Y.; LI, Q. **Detection of carcinoma in serous effusions: a review**. [*S. l.: s. n.*], 2021. Available at: www.ajcr.us/.

LIN, X.; WU, B. B.; XING, Y. Q.; WANG, D. S.; LI, J. PAX8, auseful biomarker for ovarianserous tumors. **Human Pathology**, vol. 51, p. 146, May 2016. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.045>.

LIU, H.; SHI, J.; WILKERSON, M. L.; LIN, F. Immunohistochemical Evaluation of GATA3 Expression in Tumors and Normal Tissues. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 138, no. 1, p. 57–64, 1 Jul. 2012. <https://doi.org/10.1309/ajcp5uafmsa9zqbz>.

LONARDI, S.; MANERA, C.; MARUCCI, R.; SANTORO, A.; LORENZI, L.; FACCHETTI, F. Usefulness of Claudin 4 in the cytological diagnosis of serosal effusions. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 39, no. 5, p. 313–317, May 2011. <https://doi.org/10.1002/dc.21380>.

LOSA, F.; SOLER, G.; CASADO, A.; ESTIVAL, A.; FERNÁNDEZ, I.; GIMÉNEZ, S.; LONGO, F.; PAZO-CID, R.; SALGADO, J.; SEGUÍ, M. SEOM clinical guideline on unknown primary cancer (2017). **Clinical and Translational Oncology**, vol. 20, no. 1, p. 89–96, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1807-y>.

LU, S.; YAKIREVICH, E.; HART, J.; WANG, L.; WANG, Y. PAX8 Expression in Breast

Cancer. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 29, no. 4, p. 293–298, Apr. 2021. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000883>.

LUGLI, A.; FORSTER, Y.; HAAS, P.; NOCITO, A.; BUCHER, C.; BISSIG, H.; MIRLACHER, M.; STORZ, M.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G. Calretinin Expression in Human Normal and Neoplastic Tissues: A Tissue Microarray Analysis on 5233 Tissue Samples. **Human Pathology**, vol. 34, no. 10, p. 994–1000, 2003. [https://doi.org/10.1053/S0046-8177\(03\)00339-3](https://doi.org/10.1053/S0046-8177(03)00339-3).

MCKNIGHT, R.; COHEN, C.; SIDDIQUI, M. T. Utility of paired box gene 8 (PAX8) expression in fluid and fine-needle aspiration cytology: An immunohistochemical study of metastatic ovarian serous carcinoma. **Cancer Cytopathology**, vol. 118, no. 5, p. 298–302, 2010. <https://doi.org/10.1002/cncy.20089>.

METZGEROTH, G.; KUHN, C.; SCHULTHEIS, B.; HEHLMANN, R.; HASTKA, J. Diagnostic accuracy of cytology and immunocytology in carcinomatous effusions. **Cytopathology**, vol. 19, no. 4, p. 205–211, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2007.00468.x>.

MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; WANG, D.; MENESSES, T.; CHANDAVARKAR, U.; OUGH, F.; LIN, Y.; LIU, S. Pax-8 is a reliable marker in making the diagnosis in advanced stage epithelial ovarian carcinoma and primary peritoneal carcinoma for neoadjuvant chemotherapy on cell block and biopsy specimens. **Histopathology**, vol. 60, no. 6, p. 1019–1020, May 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04172.x>.

MIETTINEN, M.; MCCUE, P. A.; SARLOMO-RIKALA, M.; RYS, J.; CZAPIEWSKI, P.; WAZNY, K.; LANGFORT, R.; WALOSZCZYK, P.; BIERNAT, W.; LASOTA, J.; WANG, Z. GATA3: A multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: A systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. **American Journal of Surgical Pathology**, vol. 38, no. 1, p. 13–22, 2014. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182a0218f>.

MOCANU, L.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. Value of antimesothelioma HBME-1 in the diagnosis of inflammatory and malignant pleural effusions. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, vol. 47, no. 4, p. 351–355, 2006. .

MOHANTY, S. K.; DEY, P. Serous effusions: Diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. **Postgraduate Medical Journal**, vol. 79, no. 936, p. 569–574, 2003. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.936.569>.

MORGAN, R. L.; DE YOUNG, B. R.; MCGAUGHY, V. R.; NIEMANN, T. H. MOC-31 aids in the differentiation between adenocarcinoma and reactive mesothelial cells. **Cancer**, vol. 87, no. 6, p. 390–394, 25 Dec. 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19991225\)87:6<390::AID-CNCR10>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19991225)87:6<390::AID-CNCR10>3.0.CO;2-4).

NADJI, M.; GOMEZ-FERNANDEZ, C.; GANJEI-AZAR, P.; MORALES, A. R. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: Experience with 5,993 breast cancers. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 123, no. 1, p. 21–27, 2005. <https://doi.org/10.1309/4WV79N2GHJ3X1841>.

NAKAMURA, N.; MIYAGI, E.; MURATA, S. ichi; KAWAOI, A.; KATOH, R. Expression of thyroid transcription factor-1 in normal and neoplastic lung tissues. **Modern Pathology**, vol. 15, no. 10, p. 1058–1067, 1 Oct. 2002. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000028572.44247.CF>.

NAKAYAMA, Y.; NAKAGOMI, H.; OMORI, M.; INOUE, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; TAKANO, A.; FURUYA, K.; AMEMIYA, K.; ISHII, E.; OYAMA, T. Benefits of using the cell block method to determine the discordance of the HR/HER2 expression in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer**, vol. 23, no. 4, p. 633–639, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12282-015-0615-x>.

NASO, J. R.; CHURG, A. Claudin-4 shows superior specificity for mesothelioma vs non-small-cell lung carcinoma compared with MOC-31 and Ber-EP4. **Human pathology**, vol. 100, p. 10–14, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.04.005>.

NASUTI, J. F.; GUPTA, P. K.; BALOCH, Z. W. Diagnostic value and cost-effectiveness of on-site evaluation of fine-needle aspiration specimens: Review of 5,688 cases. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 27, no. 1, p. 1–4, 2002. <https://doi.org/10.1002/dc.10065>.

NATHAN, N. A.; NARAYAN, E.; SMITH, M. M.; HORN, M. J. Cell block cytology: Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 114, no. 4, p. 599–606, 2000. <https://doi.org/10.1309/G035-P2MM-D1TM-T5QE>.

NONAKA, D.; CHIRIBOGA, L.; SOSLOW, R. A. Expression of Pax8 as a useful marker in distinguishing ovarian carcinomas from mammary carcinomas. **American Journal of Surgical Pathology**, vol. 32, no. 10, p. 1566–1571, 2008. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31816d71ad>.

OATES; EDWARDS. HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. **Histopathology**, vol. 36, no. 4, p. 341–347, Apr. 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00770.x>.

OIEN, K. A.; DENNIS, J. L. Diagnostic work-up of carcinoma of unknown primary: From immunohistochemistry to molecular profiling. **Annals of Oncology**, vol. 23, no. SUPPL. 10, 2012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds357>.

OKAMOTO. Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. **Oncology Reports**, vol. 21, no. 5, p. 223–30, 6 Apr. 2009. https://doi.org/10.3892/or_00000343.

ORDÓÑEZ, N. G. Value of GATA3 immunostaining in tumor diagnosis: A review. **Advances in Anatomic Pathology**, vol. 20, no. 5, p. 352–360, 2013. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a28a68>.

ORDÓÑEZ, N. G. Value of Thyroid Transcription Factor-1 Immunostaining in Tumor Diagnosis. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 20, no. 5, p. 429–444, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31825439bc>.

ORDÓÑEZ, N. G.; SAHIN, A. A. Diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid pleural mesotheliomas and breast carcinomas: a comparative study ☆☆☆. 2014. DOI 10.1016/j.humpath.2014.03.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2014.03.006>.

PAI, R. K.; WEST, R. B. MOC-31 exhibits superior reactivity compared with Ber-EP4 in invasive lobular and ductal carcinoma of the breast: A tissue microarray study. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, vol. 17, no. 3, p. 202–206, 2009. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31818c0f42>.

PENG, Y.; BUTT, Y. M.; CHEN, B.; ZHANG, X.; TANG, P. Update on Immunohistochemical Analysis in Breast Lesions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 141, no. 8,

p. 1033–1051, 1 Aug. 2017a. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0482-RA>.

PENG, Y.; BUTT, Y. M.; CHEN, B.; ZHANG, X.; TANG, P. Update on Immunohistochemical Analysis in Breast Lesions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 141, no. 8, p. 1033–1051, 1 Aug. 2017b. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0482-RA>.

PEREIRA, M. G. **Artigos científicos; como redigir, publicar e avaliar**. 1a. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia Teoria e Prática**. 1^a. Brasília: Guanabara-Koogan, 2008.

PEREIRA, T. C.; SAAD, R. S.; LIU, Y.; SILVERMAN, J. F. The Diagnosis of Malignancy in Effusion Cytology: A Pattern Recognition Approach. **Advances in Anatomic Pathology**, vol. 13, no. 4, p. 174–184, Jul. 2006. <https://doi.org/10.1097/00125480-200607000-00004>.

POMJANSKI, N.; GROTE, H. J.; DOGANAY, P.; SCHMIEMANN, V.; BUCKSTEGGE, B.; BÖCKING, A. Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 33, no. 5, p. 309–315, 2005. <https://doi.org/10.1002/dc.20393>.

PORCEL, J. M. Biomarkers in the diagnosis of pleural diseases: a 2018 update. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, vol. 12, p. 1–11, 2018. <https://doi.org/10.1177/1753466618808660>.

REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. N. J. Triple negative tumours: A critical review. **Histopathology**, vol. 52, no. 1, p. 108–118, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x>.

REN, S.; KLUMP, W. Gynecologic Serous Carcinoma: An Immunohistochemical Analysis of Malignant Body Fluid Specimens. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 143, no. 6, p. 677–682, 1 Jun. 2019. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0260-OA>.

ROBENS, J.; GOLDSTEIN, L.; GOWN, A. M.; SCHNITT, S. J. Thyroid transcription factor-1 expression in breast carcinomas. **The American journal of surgical pathology**, vol. 34, no. 12, p. 1881–5, Dec. 2010. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181f884e8>.

RODRIGUEZ, E. F.; CHOWSILPA, S.; MALEKI, Z. The differential diagnosis in nonlymphoproliferative malignant pleural effusion cytopathology and its correlation with

patients' demographics. **Acta Cytologica**, vol. 62, no. 5–6, p. 436–442, 2018. <https://doi.org/10.1159/000493336>.

SANGOI, A. R.; SHRESTHA, B.; YANG, G.; MEGO, O.; BECK, A. H. The novel marker GATA3 is significantly more sensitive than traditional markers mammaglobin and GCDFP15 for identifying breast cancer in surgical and cytology specimens of metastatic and matched primary tumors. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, vol. 24, no. 4, p. 229–237, 2016. <https://doi.org/10.1097/PAI.000000000000186>.

SAWH, R. N.; MALPICA, A.; DEEVERS, M. T.; LIU, J.; SILVA, E. G. Benign cystic mesothelioma of the peritoneum: A clinicopathologic study of 17 cases and immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptor status. **Human Pathology**, vol. 34, no. 4, p. 369–374, 2003. <https://doi.org/10.1053/hupa.2003.31>.

SCHNELL, U.; CIRULLI, V.; GIEPMANS, B. N. G. EpCAM: Structure and function in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1828, no. 8, p. 1989–2001, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.018>.

SCHRIJVER, W. A. M. E.; PEETERS, T.; TER HOEVE, N.; VAN DIEST, P. J.; MOELANS, C. B.; SCHURMAN, K.; VAN ROSSUM, A.; ZWART, W.; CONSORTIUM, D. D. B. C. M.; PEETERS, T.; TER HOEVE, N.; ZWART, W.; VAN DIEST, P. J.; MOELANS, C. B. Loss of steroid hormone receptors is common in malignant pleural and peritoneal effusions of breast cancer patients treated with endocrine therapy. **Oncotarget**, vol. 8, no. 33, p. 55550–55561, 15 Aug. 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15548>.

SELVES, J.; LONG-MIRA, E.; MATHIEU, M. C.; ROCHAIX, P.; ILIÉ, M. Immunohistochemistry for diagnosis of metastatic carcinomas of unknown primary site. **Cancers**, vol. 10, no. 4, p. 1–23, 2018. <https://doi.org/10.3390/cancers10040108>.

SHEN, Y.; PANG, C.; SHEN, K.; WU, Y.; LI, D.; WAN, C.; LIAO, Z.; YANG, T.; CHEN, L.; WEN, F. Diagnostic value of thyroid transcription factor-1 for pleural or other serous metastases of pulmonary adenocarcinoma: a meta-analysis. **Scientific reports**, vol. 6, p. 19785, 25 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep19785>.

SHEN, Z.; LUO, H.; LI, S.; SHENG, B.; ZHAO, M.; ZHU, H.; ZHU, X. Correlation between estrogen receptor expression and prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis.

Oncotarget, vol. 8, no. 37, p. 62400–62413, 22 Sep. 2017. DOI 10.18632/oncotarget.18253. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977954>.

SHIDHAM, V.; VARSEGI, G.; D'AMORE, K. Two-color immunocytochemistry for evaluation of effusion fluids for metastatic adenocarcinoma. **CytoJournal**, vol. 7, p. 1–9, 2010. <https://doi.org/10.4103/1742-6413.59887>.

SIMSIR, A.; FETSCH, P.; MEHTA, D.; ZAKOWSKI, M.; ABATI, A. E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: The good, the bad, the worthless. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 20, no. 3, p. 125–130, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0339\(199903\)20:3<125::AID-DC3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0339(199903)20:3<125::AID-DC3>3.0.CO;2-V).

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. Parecer 32. 2008. Available at: <http://www.sbp.org.br/pareceres/parecer-32/>. Accessed on: 26 Dec. 2021.

STERNBERGER, L.; HARDY, P.; CUCULIS, J.; MEYER, G. Preparation and Properties of Soluble Antigen-Antibody Complex and Its Use in Identification of Spirochetes. **Journal of Histochemistry and cytochemistry**, vol. 18, p. 315–333, 1970. .

SUNDLING, K. E.; CIBAS, E. S. Ancillary studies in pleural, pericardial, and peritoneal effusion cytology. **Cancer Cytopathology**, vol. 126, no. August, p. 590–598, 2018. <https://doi.org/10.1002/cncy.22021>.

TACHA, D.; ZHOU, D.; CHENG, L. Expression of PAX8 in Normal and Neoplastic Tissues. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 19, no. 4, p. 293–299, Jul. 2011. DOI 10.1097/pai.0b013e3182025f66. Available at: <https://journals.lww.com/00129039-201107000-00003>.

TAN, P. H.; ELLIS, I.; ALLISON, K.; BROGI, E.; FOX, S. B.; LAKHANI, S.; LAZAR, A. J.; MORRIS, E. A.; SAHIN, A.; SALGADO, R.; SAPINO, A.; SASANO, H.; SCHNITT, S.; SOTIRIOU, C.; VAN DIEST, P.; WHITE, V. A.; LOKUHETTY, D.; CREE, I. A. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. **Histopathology**, vol. 77, no. 2, p. 181–185, 2020. <https://doi.org/10.1111/his.14091>.

TANDON, R. T.; JIMENEZ-CORTEZ, Y.; TAUB, R.; BORCZUK, A. C. Immunohistochemistry in peritoneal mesothelioma a single-center experience of 244 cases. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, vol. 142, no. 2, p. 236–242, 2018.

<https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0092-OA>.

TO, K.-F. & TSE, G. M. TTF-1 expression in breast carcinoma: an unusual but real phenomenon. **Histopathology**, vol. 64, p. 504–511, 2014. <https://doi.org/10.1111/his.12287>.

TONG, G.-X.; DEVARAJ, K.; HAMELE-BENA, D.; YU, W. M.; TURK, A.; CHEN, X.; WRIGHT, J. D.; GREENEBAUM, E. Pax8: A marker for carcinoma of Müllerian origin in serous effusions. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 39, no. 8, p. 562–566, Aug. 2011. DOI 10.1002/dc.21426. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.21426>.

TURNER, B. M.; CAGLE, P. T.; SAINZ, I. M.; FUKUOKA, J.; SHEN, S. S.; JAGIRDAR, J. Napsin A , a New Marker for Lung Adenocarcinoma , Is Complementary and More Sensitive and Specific Than Thyroid Transcription Factor 1 in the Differential Diagnosis of Primary Pulmonary Carcinoma. **Arch Pathol Lab Med**, vol. 136, no. February, 2012. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0320-OA>.

UEDA, K.; ADACHI, Y.; LIU, P.; FUKUMA, N.; TAKIMOTO, E. Regulatory Actions of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 10, 10 Jan. 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00909>.

VAN DER LOOS, C. M. Chromogens in multiple immunohistochemical staining used for visual assessment and spectral imaging: The colorful future. **Journal of Histotechnology**, vol. 33, no. 1, p. 31–40, 2010. <https://doi.org/10.1179/his.2010.33.1.31>.

VIDARSDOTTIR, H.; TRAN, L.; NODIN, B.; JIRSTRÖM, K.; PLANCK, M.; JÖNSSON, P.; MATTSSON, J. S. M.; BOTLING, J.; MICKE, P.; BRUNNSTRÖM, H. Immunohistochemical profiles in primary lung cancers and epithelial pulmonary metastases. **Human Pathology**, vol. 84, p. 221–230, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.10.009>.

WARTH, A.; MULEY, T.; HERPEL, E.; MEISTER, M.; HERTH, F. J. F.; SCHIRMACHER, P.; WEICHERT, W.; HOFFMANN, H.; SCHNABEL, P. A. Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. **Histopathology**, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04308.x>.

WATERS, L.; CRUMLEY, S.; TRUONG, L.; MODY, D.; COFFEY, D. PAX2 and PAX8: Useful markers for metastatic effusions. **Acta Cytologica**, vol. 58, no. 1, p. 60–66, 2014. <https://doi.org/10.1159/000356426>.

WISEMAN, W.; MICHAEL, C. W.; ROH, M. H. Diagnostic utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of metastatic Müllerian carcinoma in effusions. **Diagnostic Cytopathology**, vol. 39, no. 9, p. 651–656, Sep. 2011. <https://doi.org/10.1002/dc.21442>.

WRIGHT, J. R. Cytopathology: Why Did It Take So Long To Thrive? **Diagnostic Cytopathology**, vol. 43, no. 3, p. 257–263, Mar. 2015. <https://doi.org/10.1002/dc>.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. IMMUNOASSAY OF ENDOGENOUS PLASMA INSULIN IN MAN. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 39, no. 7, p. 1157–1175, 1 Jul. 1960. <https://doi.org/10.1172/JCI104130>.

YANG, Y.; LU, S.; ZENG, W.; XIE, S.; XIAO, S. GATA3 expression in clinically useful groups of breast carcinoma: a comparison with GCDFP15 and mammaglobin for identifying paired primary and metastatic tumors. **Annals of Diagnostic Pathology**, vol. 26, p. 1–5, 1 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2016.09.011>.

YE, J.; FINDEIS-HOSEY, J. J.; YANG, Q.; MCMAHON, L. A.; YAO, J. L.; LI, F.; XU, H. Combination of Napsin A and TTF-1 Immunohistochemistry Helps in Differentiating Primary Lung Adenocarcinoma From Metastatic Carcinoma in the Lung. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, vol. 19, no. 4, p. 313–317, Jul. 2011. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318205b059>.

YU, G. H.; GLASER, L. J.; GUSTAFSON, K. S. Role of Ancillary Techniques in Fluid Cytology. **Acta Cytologica**, vol. 64, no. 1–2, p. 52–62, 2020. <https://doi.org/10.1159/000496568>.

ZHAO, Lianhua; MAO, C.; XIAO, H.; FU, P.; XIAO, H.; CHEN, C.; WANG, G. Simultaneous expression of TTF1 and GATA3 in a lung biopsy sample: confusion in diagnostic pathology. **International journal of clinical and experimental pathology**, vol. 12, no. 9, p. 3613–3619, 2019.

ZHAO, Lichao; GUO, M.; SNEIGE, N.; GONG, Y. Value of PAX8 and WT1 Immunostaining in Confirming the Ovarian Origin of Metastatic Carcinoma in Serous Effusion Specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 137, no. 2, p. 304–309, 1 Feb. 2012. <https://doi.org/10.1309/AJCPU0FION3RKKFO>.

8. ANEXOS

8.1. TÉCNICAS UTILIZADAS:

APÊNDICE A - Preparo de PBS

- NaCl (137mM)
- KCl (2,7mM)
- Na₂HPO₄ (10mM)
- KH₂PO₄ (2mM)
- Ajustar o pH para 7,4
- Completar o volume com água destilada para 1 L e autoclavar

APÊNDICE B - Preparo tampão de hemólise

- NH₄Cl (145 mM)
- NH₄HCO₃ (10 mM)
- Completar o volume com água destilada para 2 L e autoclavar

APÊNDICE C- Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina. 0,48% (p/v)
- Etanol absoluto 4,8% (v/v)
- KAl(SO₄)₂ (384 mM)
- HgO (11mM)
- Completar o volume com água destilada para 1.050 mL

Protocolo: Dissolver o alumínio em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético. Misture a hematoxilina no etanol à temperatura ambiente em outro recipiente separado. Lentamente, combinar as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retirar da fonte de calor e acrescentar lentamente o óxido mercúrio. Retornar a solução para a fonte de calor até que tome a tonalidade púrpuro-escura. Aguardar esfriar.

APÊNDICE D - Corante orange G:

I- Solução estoque de orange G 10%

- Orange G - 10% (m/v)
- Completar o volume com água destilada para 100 mL

II- Solução de uso do orange G :

- Solução estoque 2% (v/v)
- $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ (0,0624 mM)
- Etanol 95% - 98%(v/v)

APÊNDICE E - Corante EA-65:

I- Soluções estoque eosina Y a 20%:

- Eosina Y 20% (m/v) em água destilada

II- Solução estoque *light-green* SF a 3%:

- *Light-green* SF 3% (p/v) em água destilada

III- Solução de uso do EA-65:

- Solução estoque de eosina Y - 2% (v/v)
- Solução estoque de *light-green* SF- 1% (v/v)
- $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ – 0,832 mM
- Etanol 95% - 70% (v/v)
- Metanol absoluto- 25% (v/v)
- Ácido acético glacial- 2% (v/v)

APÊNDICE F - Preparo da solução de recuperação

I- Tampão citrato

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12mM) em água destilada
- Completar o volume com água destilada para 1L
- Ajustar o pH para 6 e armazenar em geladeira

II- Solução de recuperação

- Tampão citrato - 250 mL
- Tween 20 – 0,0002% v/v

APÊNDICE G – Preparo de tampão TBS

I- Preparo do Tris pH 7,3

- Tris (0,2 M)
- HCl (N/10)
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira

II- Preparo do tampão TBS

- Tris pH 7,3 – 11% v/v
- NaCl (146,5 mM)
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira

8.2. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA VIABILIDADE TÉCNICA E FINANCEIRA DO PREPARO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER E DOENÇAS INFECCIOSAS NO SUS

Pesquisador: FABIANA PIRANI CARNEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34150314.9.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 768.140

Data da Relatoria: 27/08/2014

Apresentação do Projeto:

O estudo de amostras citológicas (líquido pleural, líquido ascítico, líquido pericárdico, lavados peritoneal e broncoalveolar, liquor, descarga mamilar, aspirados de mama e tireoide) é um procedimento de rotina no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com cânceres de elevada incidência e morbimortalidade como carcinomas de mama, próstata, pulmão, estômago e tireoide, etc. Amostras citológicas são também usadas para o diagnóstico de doenças infecciosas crônicas bacterianas e fúngicas. A citologia é um método diagnóstico acessível, rápido, de baixo custo e pouco invasivo, mas apresenta sensibilidade e especificidade baixas decorrente principalmente da escassez de células neoplásicas e de agentes infecciosos encontrados nas amostras. Embocado celular ou "cell block" consiste em uma forma de preparação da amostra citológica em que as amostras são citocentrifugadas, embocadas em parafina e submetidas a processamento histológico habitual e tem como vantagem a possibilidade de realização de reações imunocitoquímicas e de colorações especiais para aumentar a sensibilidade e especificidade da citologia. Atualmente, nos

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 768.140

laboratórios de Anatomia Patológica, apenas parte das amostras é citocentrifugada sendo a amostra residual desprezada e os emblocados preparados apenas daquelas amostras que apresentam resíduos sólidos. A aplicação e mistura de plasma e tromboplastina nos citocentrifugados possibilita a formação de coágulos, contendo células do centrifugado da amostra, os quais podem ser emblocados em parafina. Através deste método plasma-tromboplastina qualquer e toda a amostra poderia ser emblocada, arquivada e ser utilizada para estudo imuno-histoquímico e colorações especiais.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo tem por objetivo avaliar a viabilidade técnica e financeira do emprego método plasma-tromboplastina na preparação de emblocados celulares de amostras citológicas (líquido pleural, ascítico, líquido pericárdico, lavados peritoneal e broncoalveolar, liquor, descarga mamilar, aspirados de mama e tireoide), bem como avaliar o número, distribuição e preservação das células, a expressão de marcadores imunocitoquímicos e colorações especiais nos emblocados celulares preparados pelo método plasma-tromboplastina e avaliar a sensibilidade e especificidade do método, considerando o resultado do estudo histopatológico com método padrão-ouro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os procedimentos usados para a coleta de amostras são procedimentos padronizados e realizados na rotina, o que não acarretará ao paciente risco ou desconforto adicional, visto que serão coletadas as amostras citológicas após procedimentos de intervenção rotineiros inerentes à assistência médica prestada aos pacientes. Ademais, serão utilizadas as amostras descartadas pelo laboratório de análises clínicas.

Benefícios:

O emprego de novas técnicas na pesquisa de células neoplásicas pode resultar em aumento significativo da sensibilidade da citologia e da imunocitoquímica que são técnicas empregadas na rotina do laboratório de anatomia patológica para o diagnóstico de neoplasias primárias e metastáticas e, conseqüentemente, para o estabelecimento da conduta, estadiamento e

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 768.140

prognóstico do paciente com câncer. Além disso, trata-se de proposta de emprego de técnica acessível e de custo baixo e que poderia ser aplicada em serviços públicos de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é de grande relevância pois uma vez que irá verificar a viabilidade de métodos diagnósticos que visem à detecção precoce e acompanhamento do câncer e de doenças infecciosas crônicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresenta toda a documentação exigida e também solicita a dispensa do TCLE, o que considero pertinente tendo em vista que serão utilizadas na pesquisa apenas as amostras residuais.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que:

O projeto está bem instruído, a justificativa para o pesquisa é clara e bem fundamentada;

A solicitação de dispensa do uso do TCLE é pertinente;

O procedimento de coleta de dados não acarreta riscos aos sujeitos;

Não há pendências ou inadequações referentes ao projeto de pesquisa analisado, sou de parecer favorável à aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado por maioria aprovou o projeto, na íntegra. Vencido, parcialmente, um dos membros, que não aprovou a liberação do TCLE.

Considerando que:

O projeto está bem instruído, a justificativa para o pesquisa é clara e bem fundamentada;

A solicitação de dispensa do uso do TCLE é pertinente;

O procedimento de coleta de dados não acarreta riscos aos sujeitos;

Não há pendências ou inadequações referentes ao projeto de pesquisa analisado, sou de parecer favorável à aprovação do projeto.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 768.140

BRASILIA, 27 de Agosto de 2014

Assinado por:
Diaulas Costa Ribeiro
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

8.4. CARTA DE ACEITAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL PARA PUBLICAÇÃO

gustavo henrique soares takano

De: International Journal of Clinical and Experimental Pathology <editorial@e-century.net>
Enviado em: terça-feira, 8 de fevereiro de 2022 04:30
Para: gustavo henrique soares takano
Assunto: [Notice] The manuscript (IJCEP0138893R3) has been reviewed

Dear Dr. Takano,

Your manuscript entitled "Initial panel of immunocytochemical markers for the identification of carcinoma primary sites in women's effusions and peritoneal washing." has been reviewed. The tracking number for this manuscript is IJCEP0138893R3

=====

Please log into your manuscript submission account at <https://e-century.us> to check your 'Payment Status' five business days after the wire payment is made. If the 'Payment Status' still shows as 'Unpaid', Please send the picture of your wire statement to invoice@e-century.org by e-mail so that we we can try to locate your payment with our bank.

=====

We are pleased to inform you that your revised manuscript has been further reviewed and now accepted for publication (check the uploaded file for details). Any remaining minor revisions will be performed by our editorial staff for the efficiency.

Please note that the status of IJCEP has been changed from SCIE to ESCI recently. Although ESCI journal itself will not get an official impact factor, articles published in ESCI journal will be still indexed in the Web of Science. Please confirm the acceptance for publication at IJCEP, so we can take action accordingly.

You will receive the PDF for proofreading from our Production Team (production@e-century.org) in a few weeks. You will also receive the invoice from our publisher (invoice@e-century.org) soon. Please pay attention to your e-mail and take appropriate actions promptly once you receive those e-mails.

If you have published more than 5 biomedical research articles in English as first and/or corresponding author, and are interested in becoming a manuscript reviewer of our journal, please visit <https://e-century.us/reviewer/app/index.php> and complete a simple application form.

Thank you for publishing this nice paper with us. We look forward to receiving more great manuscripts from you and your colleagues in the near future:

www.e-century.org

File attached: [Manuscript_Final_20220208012841_IJCEP0138893R3.docx](#)

Best regards,

Editorial Office

[International Journal of Clinical and Experimental Pathology](#)