

Tumores malignos de células germinativas do ovário: expressão de enolase neurônio-específica, alfa-1-antitripsina e alfa-1-antiquimotripsina

JOSÉ A. A. CRESPO RIBEIRO¹, FLORÊNCIO FIGUEIREDO²

Apoio financeiro da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Foi realizado um estudo imuno-histoquímico para verificar a expressão de enolase neurônio-específica (NSE), alfa-1-antitripsina (AAT) e alfa-1-antiquimotripsina (AAQT) em tumores malignos de células germinativas do ovário. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em tecidos previamente fixados em formol e embebidos em parafina de sete disgerminomas, três tumores do seio endodérmico, três teratomas imaturos e um coriocarcinoma. Todos os tumores, exceto o coriocarcinoma, expressaram NSE. As reações com os anticorpos anti-AAT e AAQT foram positivas em todos os tipos histológicos dos tumores. Estes dados sugerem que NSE, AAT ou AAQT podem ser mais um marcador para os tumores de células germinativas do ovário.

Unitermos: neoplasias do ovário; imuno-histoquímica

Introdução

Os tumores malignos de células germinativas compreendem 3 a 4% de todas as neoplasias malignas do ovário. Apesar de uma incidência baixa, são tumores de importância clínica relevante por acometerem, principalmente, crianças e mulheres jovens [1].

Os estudos imuno-histoquímicos dos tumores de células germinativas, para identificação de marcadores tumorais, começaram há mais de uma década [2, 3] e continuam, até hoje, com a disponibilidade de maior número e especificidade de anticorpos produzidos contra uma variedade de componentes e produtos celulares [4]. Entre esta variedade de substâncias, potencialmente marcadoras de tumor de células germinativas, estão a enolase neurônio-específica (NSE), a alfa-1-antitripsina (AAT) e a alfa-1-antiquimotripsina (AAQT).

A NSE é uma isoenzima da enzima glicolítica 2-fosfo-D-glicerato hidrolase, que é encontrada em te-

cidos nervosos e neuroendócrinos, porém já tendo sido demonstrada em vários outros tecidos humanos [5]. É considerada um marcador para tumores de origem neuroendócrina [6]. Com esta mesma finalidade, foi relatado seu uso para carcinoma de pequenas células de pulmão [7]. Em tumores de células germinativas, a NSE foi demonstrada em seminoma do testículo [8] e em disgerminoma e teratoma do ovário [9].

A AAT e a AAQT são duas proteínas que possuem atividade antiproteolítica e estão distribuídas no fígado, pâncreas e mucosa gastrointestinal [10, 11]. O significado biológico da ocorrência destas proteínas em tecidos tumorais não é bem conhecido. Elas têm sido demonstradas em tumores do trato gastrointestinal [12] e de glândulas salivares [13]. A identificação da AAT em tumores de células germinativas, por Palmer et al. [2], representa uma das primeiras caracterizações desta proteína como marcador tumoral.

O objetivo deste estudo é verificar, através da imuno-histoquímica, a expressão destas proteínas

¹Pós-graduando do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia; ²Docente do Departamento de Patologia. Endereço do autor para correspondência: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto, SP - CEP 14049

(NSE, AAT e AAQT) em tumores malignos de células germinativas do ovário.

Material e Métodos

O estudo foi realizado com 14 tumores malignos de células germinativas do ovário registrados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Departamentos de Ginecologia e Obstetrícia e de Patologia). Os tipos histológicos foram classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde [14], ficando assim distribuídos: sete disgerminomas, três tumores do seio endodérmico, três teratomas imaturos e um coriocarcinoma.

Todas as reações imuno-histoquímicas foram realizadas em tecido previamente fixado em formol e embebido em parafina. Foi utilizado o método peroxidase-antiperoxidase (PAP), descrito por Sternberger [15], com algumas modificações para atender às necessidades do laboratório de Patologia (HC-FMRP). Cortes de 5 mm foram desparafinizados em xilol e hidratados numa bateria de álcool, em seguida os cortes foram lavados com água destilada e salina fosfato tamponado (PBS), pH 7,2-7,4 e tratados com água oxigenada (H_2O_2) a 3% e metanol a 3% em PBS, por 10 minutos. Após lavados com PBS, foram cobertos com 0,5 mg/ml de tripsina diluída em tampão TRIS 0,05M, pH 7,8 (exceto para as reações com AAT). Em seguida, os cortes foram tratados com soro normal de camundongo ou coelho, por 30 minutos e, posteriormente, incubados por 1 hora em câmara úmida a 25°C, com os anticorpos policlonais anti-NSE na diluição de 1:200, AAT na diluição de 1:400 e AAQT na diluição de 1:400, todos provenientes de Dakopatts, Dinamarca. Após a lavagem dos cortes em PBS, foi adicionado o anticorpo de ligação cabra anticoelho

na diluição de 1:500 e, depois de 30 minutos de incubação, procedeu-se nova lavagem. A incubação seguinte foi feita com o complexo PAP (soro de cabra anticoelho conjugado com peroxidase) na diluição de 1:40. Finalmente, os sítios imunorreativos foram revelados pela imersão dos fragmentos em solução contendo 3,3-diaminobenzidina-HCl a 0,0125% e H_2O_2 a 0,002% em tampão TRIS-HCe, pH 7,6. Os cortes foram desidratados em álcool, contracolorados com hematoxilina e montados. Foram empregados controles positivo e negativo para excluir reações inespecíficas causadas pelo método ou por inespecificidade dos anticorpos.

O critério utilizado para avaliação foi subjetivo quali/quantitativo para definir intensidade da reação: reação negativa (-), reação fracamente positiva (+), reação moderadamente positiva (++) e reação fortemente positiva (+++/++++).

Resultados

Todos os disgerminomas expressaram a NSE. Em seis casos foram reações fracamente positivas e, em um, reação moderadamente positiva. Os três tumores do seio endodérmico expressaram NSE com uma intensidade moderada. Os teratomas imaturos expressaram NSE, principalmente nas áreas de tecido nervoso (Figura 1). O coriocarcinoma foi o único tipo histológico que não expressou a NSE.

Com relação à AAET e AAQT, todos os tumores expressaram estas proteínas, com reações moderada a fortemente positivas. Todos estes dados encontram-se na Tabela 1.

Discussão

Todos os tumores malignos de células germinativas do ovário deste estudo, com exceção do corio-

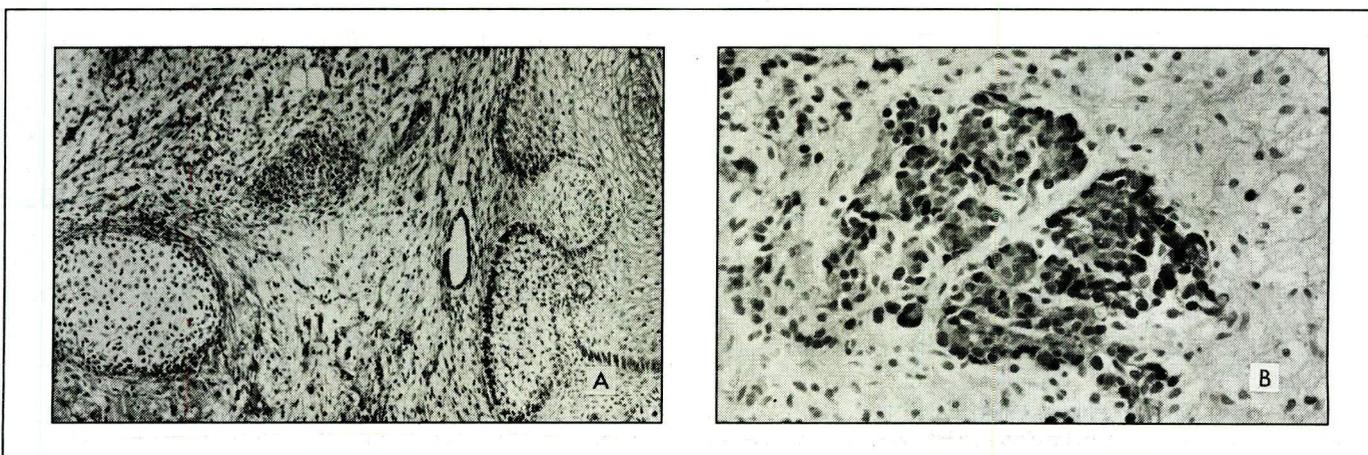


Figura 1A - Teratoma imaturo com evidência de tecido epitelial nervoso e cartilagem (HE, 300x). **B** - Imuno-histoquímica com anticorpo antienolase neurônio específica em tecido nervoso, constituinte de teratoma imaturo (470x).

Tabela 1. Expressão de enolase neuroespecífica (NSE), alfa-1-antitripsina (AAT) e alfa-1-antiquimotripsina (AAQT) em tumores malignos de células germinativas do ovário

Tipo histológico	Anticorpo anti-		
	NSE	AAT	AAQT
Disgerminoma	+	+++	++++
Disgerminoma	+	++++	++++
Disgerminoma	+	++++	+++
Disgerminoma	+	+++	+
Disgerminoma	+	++	+++
Disgerminoma	+	+++	++++
Disgerminoma	+++	++++	+++
Tumor do seio endodérmico	++	++++	++++
Tumor do seio endodérmico	++	++++	++++
Tumor do seio endodérmico	+++	++++	++++
Teratoma imaturo	+++	++++	++++
Teratoma imaturo	+++	++++	++++
Teratoma imaturo	++	++++	++++
Coriocarcinoma	-	++	+++

carcinoma, expressaram NSE. O disgerminoma expressou menos intensamente que o tumor do seio endodérmico e o teratoma imaturo. Niehans et al. [4] encontraram positividade para NSE em tumores de células germinativas de várias localizações, em 84% dos seminomas/disgerminomas, em 81% dos carcinomas embrionários, em 68% dos tumores do seio endodérmico e em 46% dos coriocarcinomas (áreas focais positivas). Kawata et al. [9] demonstraram a presença de NSE em disgerminoma e teratoma do ovário. Estes autores encontraram também aumento dos níveis séricos desta proteína em quatro de oito pacientes com teratoma e em cinco de seis pacientes com disgerminoma. Kuzmits et al. [8] já haviam demonstrado a utilização da NSE como um marcador sérico, para monitorização de tratamento, em seminoma de testículo.

Tanto AAT como AAQT foram expressados pelos diversos tipos histológicos de tumores de células germinativas do ovário, que foram estudados. A maioria das reações foram fortemente positivas para estas duas proteínas. Palmer et al. [2] caracterizaram a AAT como uma proteína de marcação tumoral, ao demonstrar a sua presença em tecido e soro de pacientes com tumor do seio endodérmico. Observaram também um paralelismo entre esta proteína e a alfa-fetoproteína, conhecidamente o mais importante marcador para o tumor do seio endodérmico. Niehans et al. [4] encontraram expressão de AAT em tumores de células germinativas primários e metastáticos. Apesar de desconhecida a função da AAT e AAQT, sua presença em tecidos tumorais pode sugerir um mecanismo de controle para prevenir a degradação

celular, durante o crescimento neoplásico [13].

Os achados deste estudo mostram que os tumores malignos de células germinativas do ovário expressam NSE, AAT e AAQT. Sugerem ainda que estas proteínas, apesar de inespecíficas, podem ser mais um marcador para estes tumores. Como podem ser dosadas no soro, poderão ser úteis para o controle da resposta terapêutica e seguimento das pacientes com tumor maligno de células germinativas do ovário.

Summary

An immunohistochemical study for the presence of neuron-specific enolase (NSE), alfa-1-antitrypsin (AAT) and alfa-1-antichymotrypsin (AAQT) in germ cell tumor of the ovary was realized. The immunohistochemical stains were performed on paraffin-embedded tissue of seven dysgerminomas, three endodermal sinus tumors, three imature teratomas and un choriocarcinoma. NSE reactivity was identified in all tumors except choriocarcinoma. All histologic types of tumors showed positive reactions for AAT e AAQT. This data indicates that NSE, AAT e AAQT may be tumor markers for germ cell tumors of the ovary.

Key words: ovarian neoplasms; immunohistochemistry

Referências bibliográficas

- KURMAN RJ, NORRIS HJ. Malignant germ cell tumors of the ovary. *Human Pathol* 1977; 8(5): 551-564.
- PALMER PE, SAFAH H, WOLFE HJ. Alpha-1-antitrypsin and alpha-fetoprotein. Protein markers in endodermal sinus (yolk sac) tumors. *Am J Clin Pathol* 1976; 65: 575-582.
- KURMAN RJ, SCARDINO PT, McINTIRE R, WALDMANN TA, JAVADPOUR N. Cellular localization of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using an indirect immunoperoxidase technique. A new approach to classification utilizing tumor markers. *Cancer* 1977; 40(5): 2136-2151.
- NIEHANS GA, MARIVEL C, COPLAND GT, SCHEITHAVER BW, WICK MR. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer* 1988; 62(6): 1113-1123.
- HAIMOTO H, TAKAHASHI Y, KOSHIKAWA T, WAGURA H, KATO K. Immunohistochemical localization of Enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. *Lab Invest* 1985; 52(3): 257-263.
- PRINZ RA, MARANGOS PT. Use of neuron-specific enolase as a serum, marker for neuroendocrine neoplasms. *Surgery* 1982; 92: 887-889.
- CARNEY DN, MARANGOS PJ, IHDE DC, BUNN PA, COHEN MH, MINNA JD, GAZDAR AF. Serum neuron-specific enolase: A marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer. *Lancet* 1982; 583-585.
- KUZMITS R, SCHERNTHANER G, KRISCH K. Serum neuron-specific Enolase. A marker for response to therapy in seminoma.

- Cancer 1987; 60(5): 1017-1021.
9. KAWATA M, SEKIYA S, HATAKEYAMA R, TAKAMIZAWA H. Neuron-specific Enolase as a serum marker for immature teratoma and dysgerminoma. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 191-197.
 10. GAULDIE J, LAMONTAGNE L, HORSEWOOD P, JENKINS E. Immunohistochemical localization of alfa-1-antitrypsin in mouse liver and pancreas. *Am J Pathol* 1980; 101: 723-735.
 11. KITTAS C, ARONI K, MATANI A, PAPADIMITRION CS. Immunocytochemical demonstration of alfa-1-antichymotrypsin in human gastrointestinal tract. *Hep Gastroenterol* 1982; 29: 275-277.
 12. KITTAS C, ARONI K, KOTSIS K, PAPADIMITRION CS. Distribution of lysozime, alfa-1-antichymotrypsin and alfa-1-antitrypsin in adenocarcinomas of the stomach and large intestine. *Virchows Arch "A"* 1982(b); 398: 139-147.
 13. MURASE N, KOBAYAASHI K, MITANI H, MORI M. Immunohistochemical localization of alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin in salivary pleomorphic adenomas. *Virchow Arch "A"* 1985; 408: 107-116.
 14. SEROV SS, SCULLY RE, SOBIN LH. Histological typing of ovarian tumors. *International histological classification of tumors. Vol. 9, Geneva, WHO, 1979.*
 15. STERNBERGER LA. *Immunocytochemistry, 2nd ed., New York, Wiley and Sons, 1979.*