

## EMA e CEA em citologia de derrames cavitários

FERNANDO C. SCHMITT<sup>1</sup>, SUELI A. MAEDA<sup>2</sup>, CARLOS E. BACCHI<sup>3</sup>

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

### Resumo

*A técnica de imunoperoxidase foi usada para testar a especificidade do CEA (antígeno carcinoembrionário) e EMA (antígeno de membrana epitelial) em células epiteliais esfoliadas de líquidos cavitários neoplásicos ou reativos. O CEA mostrou-se específico para células tumorais, derivadas de carcinomas. O EMA revelou positividade não só em células tumorais, mas em 61,5% dos líquidos não neoplásicos. A coloração para CEA mostrou-se útil não só no diagnóstico diferencial de células mesoteliais reativas e células do carcinoma, como também para a visualização de raras células tumorais isoladas em meio a células mesoteliais e inflamatórias.*

**Unitermos:** marcadores tumorais; citologia de líquidos

### Introdução

Derrame cavitário é um importante sinal de doença, requerendo precisão diagnóstica de sua etiologia. A identificação ou não de células neoplásicas nesses acúmulos de líquidos é fundamental na determinação da conduta terapêutica e na avaliação do significado prognóstico. O exame citológico do sedimento desse material tem sido método de rotina para a tentativa de caracterização das células como malignas. Contudo, usando esses métodos convencionais, resultados falsos-negativos e falsos-positivos podem eventualmente ocorrer, devido à escassez de células neoplásicas ou anormalidades morfológicas das células mesoteliais [1].

Por essas razões, uma variedade de técnicas tem sido aplicada no material de citologia de derrames cavitários, na tentativa de melhorar a acuidade diagnóstica. Histoquímica, microscopia eletrônica e técnicas citogenéticas têm sido utilizadas, porém com sucesso limitado, devido ao seu alto custo, dificuldades operacionais e longo tempo necessário para sua conclusão [2]. A perspectiva para o aumento da precisão diagnóstica nesse material citológico está nas técnicas imuno-histoquímicas, com identificação de antígenos celulares associados a tumores.

Dentre esses marcadores, o CEA (antígeno carci-

noembrionário) tem sido demonstrado em uma variedade de carcinomas, tais como os de estômago, cólon, mama, pâncreas, pulmão e outros órgãos. Acredita-se que esse antígeno esteja ausente em células mesoteliais reativas, como citado por Koss, em 1984 [2]. Contudo, há relatos do encontro do CEA em mesotélio reativo em derrames cavitários [3]. Há ainda autores que proclamam a diferenciação de mesotélio com carcinoma no tocante ao uso do EMA (antígeno de membrana epitelial) [4], o que é contraposto por outros [5].

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar a expressão do CEA e do EMA em nosso material de citologia de derrames cavitários, para testar a especificidade tumoral ou não desses antígenos, e principalmente para diferenciar células mesoteliais reativas ou hiperplásicas de células cancerosas.

### Material e Métodos

O material consistia de 34 citologias de derrames pleurais [22], ascíticos [10] e pericárdicos [2], sendo sete neoplasias (seis carcinomas e um linfoma) e 27 não-neoplásicos provenientes de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP "Campus de Botucatu". Após a centrifugação dos líquidos em citocentrífuga apropriada, o

<sup>1</sup>Patologista do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP; <sup>2</sup>Patologista do Hospital Amaral Carvalho - Jaú (SP); <sup>3</sup>Professor Assistente Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP - Endereço do autor para correspondência: Deptº de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - CEP: 18610 - Botucatu - SP



material foi fixado em álcool a 95% por pelo menos 24 horas. Foram coradas lâminas pela coloração de Shoor para avaliação morfológica convencional, além do estudo imunocitoquímico para a pesquisa em cada caso dos EMA e/ou CEA (Tabela 1).

**Tabela 1** - Derrames cavitários utilizados para pesquisa de EMA e CEA por técnica imunocitoquímica.

Líquidos	EMA	CEA
Pleural (22)	6	16
Ascítico (10)	1	9
Pericárdico (2)	-	2
Total (34)	7	27

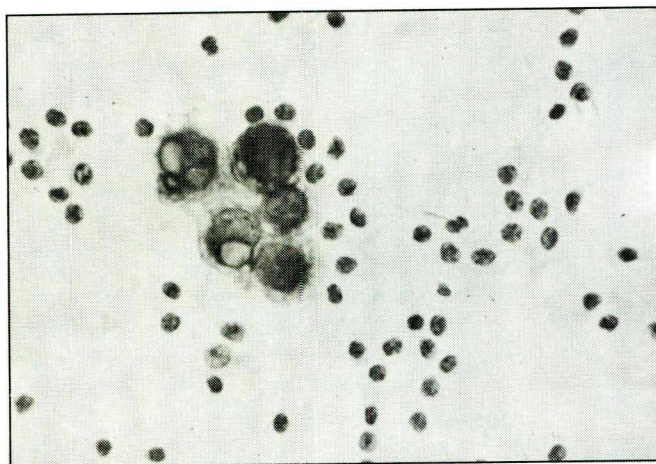
### Coloração de imunoperoxidase

A coloração de imunoperoxidase foi realizada empregando-se o método avidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu et al., em 1981 [6] e adaptado ao material citológico. Após a fixação em álcool a 95%, as lâminas foram coradas em alcoóis sucessivamente mais hidratados até solução salina tamponada (SST) em pH 7,4. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente. Inicialmente a peroxidase endógena foi bloqueada por peróxido de hidrogênio a 3% por cinco minutos. A seguir as lâminas foram incubadas com anticorpo primário específico contra CEA ou EMA por 120 minutos. O anti-CEA usado na diluição 1:300 era anticorpo policlonal produzido em coelho e absorvido amplamente com extratos de fígado, baço e papa de leucócitos, sendo gentilmente cedido pelo Dr. Thomas Edgington da Scripps Clinic - La Jolla, EUA. Já o anti-EMA (diluído a 1:10) era monoclonal de camundongo (Dako Corporation - EUA). Os anticorpos secundários, incubados por 30 minutos eram, respectivamente, no caso da pesquisa de CEA, biotinilado de cabra anticoelho diluído à proporção de 1:200 (Vector Laboratories - EUA) e, para o EMA, biotinilado de cavalo anticamundongo usado na diluição de 1:25 (Vector Laboratories - EUA). A reação foi revelada com a incubação das lâminas com 3-3'-diaminobenzidina tetra-hidroclorido (Sigma Chemicals - EUA) na concentração de 10 mg/10 ml de SST por cinco minutos, dando, em caso de reação positiva, coloração amarronzada. A seguir as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto. Entre cada etapa de incubação as lâminas foram lavadas com SST.

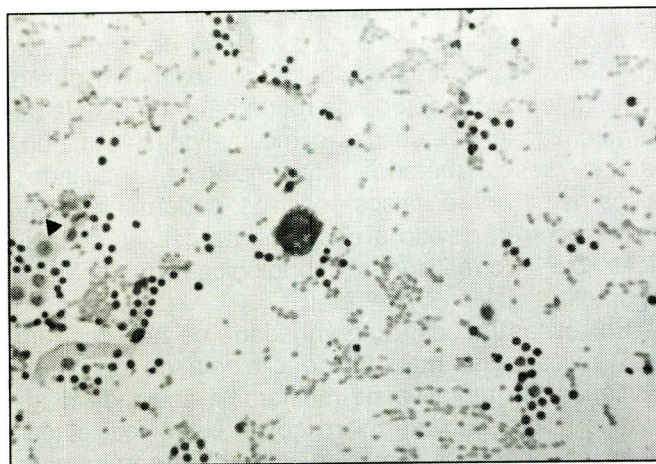
### Resultados

Dos sete líquidos neoplásicos, o EMA foi estudado em cinco, sendo positivo em células tumorais em

quatro (80%). Houve imunoposição do CEA em células de quatro casos (80%) dos cinco líquidos malignos estudados, sendo negativo apenas no caso de linfoma (Figuras 1 e 2; Tabela 2).



**Figura 1** - Adenocarcinoma de mama metastático em líquido revelando grupo de células neoplásicas intensamente coradas para CEA (antígeno carcinoembrionário) (Técnica avidina-biotina-peroxidase - 400x).



**Figura 2** - Líquido pleural com células neoplásicas isoladas de adenocarcinoma mamário com imunoposição para CEA (antígeno carcinoembrionário) e células mesoteliais negativas reativas sem positividade para CEA (seta) (Técnica avidina-biotina-peroxidase - 400x).

O EMA estudado em 13 casos dos 27 líquidos não neoplásicos mostrou-se positivo em oito (61,5%). Em contrapartida, o CEA foi negativo em todos os 16 casos de derrames não tumorais em que foi pesquisado (Figura 3; Tabela 2).



**Tabela 2** - Resultado do estudo imunocitoquímico para pesquisa de EMA e CEA em derrames cavitários.

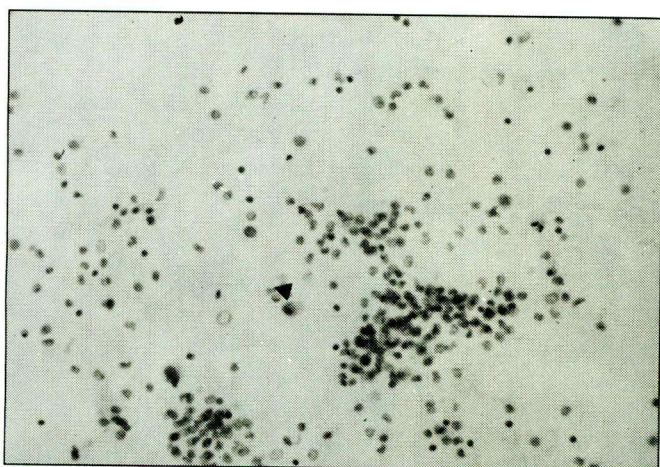
Diagnóstico	EMA				CEA		
	+++	+	Neg.	NR	+++	Neg.	NR
Neoplasia (7)							
Mama (3)	2	-	-	1	3	-	-
Pulmão (2)	1	-	1	-	1	-	1
Ovário (1)	1	-	-	-	-	-	1
Linfoma (1)	-	-	-	1	-	1	-
Não neoplasia (27)	1	7	5	14	-	16	11
<b>Total (34)</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>17</b>	<b>13</b>

+++ Reação intensa

+ Reação fraca

Neg., Reação negativa

NR, Reação não realizada

**Figura 3** - Líquido pleural inflamatório com células mesoteliais reativas sem positividade para CEA (antígeno carcinoembrionário) (seta) (Técnica avidina-biotina-peroxidase 160x).

## Discussão

Nos últimos 20 anos têm sido relatados estudos com respeito à acuidade do diagnóstico citológico de neoplasia em líquidos cavitários. Erros diagnósticos têm sido citados em até 15% dos casos e dificuldades diagnósticas podem ser encontradas em número muito maior [7]. Os erros de interpretação são frequentemente devidos às dificuldades em se distinguirem células mesoteliais reativas de células malignas apenas pelo aspecto morfológico, especialmente quando as células malignas são derivadas de adenocarcinomas bem diferenciados. Erros de interpretação também podem ocorrer quando o número de células malignas na preparação citológica é pequeno e sua

identificação em meio a células mesoteliais e inflamatórias é difícil.

A técnica de imunoperoxidase oferece várias vantagens quando usada como complemento ao exame citológico de rotina, já que permite a identificação de antígenos intracelulares, que podem oferecer informações adicionais, com aumento da precisão diagnóstica. Além disso, pode ser realizada em preparação de citocentrífuga com preservação dos detalhes morfológicos [8].

Nós estudamos a distribuição de dois marcadores tumorais CEA e EMA em células esfoliadas de derrames cavitários para verificar se esse procedimento pode resolver alguns dos problemas associados com a detecção de células malignas nesse espécime. Optamos por esses dois antígenos porque sua imunoposição tem sido associada com células neoplásicas [2-5].

Nossos resultados mostraram que o EMA não foi marcador confiável para caracterização de células malignas em líquidos cavitários, já que mostrou imunoposição em 61,5% dos casos de líquidos não-neoplásicos. Em contrapartida, o CEA ocorreu apenas em células tumorais, não sendo observado em líquidos reativos. Esse antígeno mostrou, em nosso estudo, total especificidade e sensibilidade na caracterização de células de carcinoma presentes em líquidos cavitários, inclusive decorando raras células neoplásicas presentes no líquido. O único caso de neoplasia em que o CEA foi negativo foi o de linfoma, o que já era esperado, porque essa neoplasia é de origem epitelial.

Essas observações com relação à imunoposição do CEA em células malignas têm sido confirmadas por outros autores que estudaram material de

citoinclusão de líquidos usando a técnica de imunocitoquímica para demonstração desse antígeno [8]. Esses achados, associados às nossas observações, indicam que a coloração para CEA deveria ser feita rotineiramente em todos os líquidos onde há dúvida diagnóstica ou quando há fortes suspeitas de carcinoma, do ponto de vista clínico, com relato citológico negativo.

#### Agradecimentos:

*Agradecemos às técnicas Mara Silvia Angella e Celene Maria C. Xavier de Souza, pela realização das reações imunocitoquímicas.*

#### Summary

*The immunoperoxidase technique was used to test specificity of CEA (carcinoembryonic antigen) and EMA (epithelial membrane antigen) in exfoliated cells in neoplastic and reactive effusions. CEA showed specificity for tumor cells from carcinomas. EMA had positive reaction in tumor cells as well as in 61.5% of non-neoplastic effusions. The staining for CEA showed utility either for the differential diagnosis of reactive mesothelial cells and carcinoma cells or visualization*

*of few isolated tumor cells among the mesothelial and inflammatory cells.*

**Key words:** tumor markers; effusion cytology

#### Referências bibliográficas

1. SCHNELLER J, EPPICH E, GREENEBAUM E, ELEQUIN F et al. Flow cytometry and feulgen cytophotometry in evaluation of effusions. *Cancer* 1987; 59: 1307-1313.
2. KOSS LG, COLEMAN DV. *Advances in clinical cytology*. Vol. II. USA: Masson Publishing, 1984.
3. ORELL SR, DOWLING KD. Oncofetal antigens as tumor markers in the cytologic diagnosis of effusions. *Acta Cytol* 1983; 27(1): 625-629.
4. TO A, COLEMAN DV, DEARLEY D, ORMEROD MG et al. Use of antisera to epithelial membrane antigen for the cytodiagnosis of a malignancy in serous effusions. *J Clin Pathol* 1981; 34: 1326-32.
5. HEYDERMAN E, STEELE H, ORMEROD MG. New antigen on epithelial membrane; its immunoperoxidase localization in normal and neoplastic tissue. *J Clin Pathol* 1979; 32: 35-39.
6. HSU SM, RAINE L, FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
7. STOREY DO, DINES DE, COLES DT. Pleural effusions a diagnostic dilemma. *JAMA* 1976; 236: 2183-2186.
8. WALTERS AE, SAID W. Specific tumor markers in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 1983; 27: 408-416.